

ユビキチンリガーゼCHIPによる乳がんの悪性化抑制メカニズムの解析

著者	土屋 舞
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7355号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00128894

ユビキチンリガーゼ CHIP による
乳がんの悪性化抑制メカニズムの解析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

土屋 舞

目次

要旨	1
略語	2
序論	3
結果	5
考察	12
材料及び実験手法	15
出典	22
謝辞	30
図表	31

要旨

多くの種類のがんが、遺伝子発現や悪性形質を含む様々な性質において不均一性を示すことが知られており、この不均一性は、抗がん剤耐性獲得やがんの進行に関与している。近年の研究において、蛋白質品質管理に寄与するユビキチンリガーゼ carboxyl terminus of Hsc 70-interacting protein (CHIP) の発現が、乳がんの臨床病理学的ステージや予後不良と逆相関関係にあることが示された。本研究で私は、CHIP が細胞間における遺伝子発現量の不均一性に対して緩衝作用をもち、乳がん細胞の悪性化を妨げること示した。実験から、乳がん細胞における CHIP のノックダウンは、抗アポトーシス因子やがん幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) 関連因子を含む多くの遺伝子の発現量を変化させ、乳がん細胞間におけるこれら因子の発現量の多様性を亢進させることがわかった。また、CHIP のノックダウンによって、乳がん細胞集団内で抗がん剤耐性細胞や CSC の割合が増加することも示された。これらの結果から、CHIP が、細胞間における表現型の多様性を緩衝することが示唆された。乳がん細胞株から 1 細胞由来のクローンを単離し、この細胞において CHIP をノックダウンした場合には、遺伝子発現量の多様性は変化しなかった。それに対して、このクローン細胞に変異原となる薬剤を処理すると、CHIP のノックダウンによって、遺伝子発現量の多様性や、細胞の表現型が変化した。これらの結果は、CHIP が乳がん細胞間のジェネティックな背景の違いを隠すことで、遺伝子発現量や細胞の表現型の多様性を抑えていることを示唆している。ジェネティックな多様性や CSC の性質は、表現型の不均一性を亢進させる重要な推進力となることから、本研究は、ジェネティックな背景の多様性と蛋白質品質管理のバランスが、乳がん細胞間における表現型の不均一性に影響を与えることを示していると考えられる。

略語

CHIP	<u>C</u> arboxyl terminus of <u>H</u> sc70- <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein
CSC	<u>C</u> ancer <u>s</u> tem <u>c</u> ell
HSP	<u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein
Bcl-2	<u>B</u> -cell CLL/ <u>l</u> ymphoma <u>2</u>
PQC	<u>P</u> rotein <u>q</u> uality <u>c</u> ontrol
KLF4	<u>K</u> ruppel- <u>l</u> ike <u>f</u> actor <u>4</u>
SOX2	<u>S</u> RY (sex determining region Y)- <u>b</u> ox <u>2</u>
SP	<u>S</u> ide <u>p</u> opulation
WT-1	<u>W</u> ilms <u>t</u> umor <u>1</u>
CREB	<u>C</u> yclic AMP <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement <u>b</u> inding protein
NF-κB	<u>N</u> uclear factor of <u>κ</u> light polypeptide gene enhancer in <u>B</u> -cells
E2F-1	<u>E2F</u> transcription factor <u>1</u>
BP1	<u>B</u> eta <u>P</u> rotein <u>1</u>

序論

乳がんは、最も女性が罹患しやすいがんである (1)。早期発見のための技術や、乳がんの分子メカニズムの解明による新規治療法の開発が進んでいるが、依然として、乳がんはがん罹患女性の死亡原因の一位である (1)。乳がん治療における問題の一つは、遺伝子発現や悪性形質にみられるがん細胞間の不均一性だと考えられている (2)。がんの不均一性は、がんが進行とともに性質を変えていく「がんの進化」の前段階であり、治療への耐性や、がんの悪性化の原因となる (3, 4)。がん治療への耐性は、がんの寛解を妨げると言われていることから、がんの根治を可能にする新規治療法を開発するためには、がんの不均一性の分子メカニズムを理解することが非常に重要である。

乳がんを含む多くの種類のがんは、性質的に不均一な細胞集団によって構成されている (5)。がんの不均一性は、ジェネティックやエピジェネティックな多様性、がん幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) の分化、がんを取り巻く微小環境の違いを含む、様々な原因によって引き起こされる (6)。中でも、ジェネティックやエピジェネティックな多様性と CSC の性質が、がんの不均一性促進の主要な原因として知られている。時間経過とともに、がん細胞には様々な遺伝的変化が蓄積しており、これは 1 つ 1 つの細胞に異なる性質を与える (3)。また、CSC は、正常幹細胞と似た自己増殖能を持ち、異なる形質の細胞へと分化することによってがんの不均一性を生み出すと言われている (7)。

Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) は、テトラトリコペプチドリピートドメインを持ち、Heat shock protein (HSP) と結合する蛋白質として同定された (8)。CHIP は、HSP のコシャペロンとして他の蛋白質の品質管理を行う働きや、標的蛋白質をユビキチン化し、プロテアソーム系を介した分解へと導くユビキチン E3 リガーゼとしての働きが知られている (9-11)。先行研究では、CHIP ががんの悪性化に関与する経路を阻害することにより、乳がん細胞の腫瘍増殖能と転移能を抑制すること

や、CHIP の発現量が乳がんの臨床病理学的なステージと負の相関関係を持つことが示された (12)。さらに、臨床研究において、CHIP の発現量が低下した乳がん患者は全生存率が低下することが見出され、CHIP の発現量を指標とした乳がん患者の予後予測に応用できる可能性が示唆されている (13)。しかしながら、CHIP が乳がんの進行に及ぼす影響について、分子レベルでのメカニズム解明はあまり進んでいない。

本研究において私は、CHIP の減少が、ジェネティックな背景の違いに依存して、乳がん細胞間における遺伝子発現量の不均一性を促進することを示した。さらに、実験結果から、CHIP の減少による遺伝子発現量の不均一性亢進を介して、抗がん剤耐性細胞や CSC の割合が増加することも示された。これらの結果は、CHIP が細胞間の不均一性の緩衝作用をもち、それによって、乳がん細胞の悪性化を抑制することを示唆している。

本論文は、下記の公表論文の内容に基づいている。

Tsuchiya M, *et al.* Ubiquitin ligase CHIP suppresses cancer stem cell properties in a population of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, 452(4):928-32.

Tsuchiya M, *et al.* CHIP buffers heterogeneous Bcl-2 expression levels to prevent augmentation of anti-cancer drug-resistant cell population. *Oncogene*, in press.

結果

CHIP のノックダウンはシスプラチン耐性細胞の割合を増加させる

CHIP の発現低下は、乳がん患者の予後不良と関係することが報告されている(13)。しかしながら、その根底にある分子メカニズムについては未解明である。したがって、どのように CHIP が乳がんの進行を制御するのかについて、分子レベルでの検討をおこなうため、ヒト乳がん由来細胞株において shRNA を用いて CHIP をノックダウンし (shCHIP, Figure 1、2)、抗がん剤であるシスプラチン (14) に対する感受性を試験した。シスプラチン非存在下では、shCHIP 細胞のコロニー数はコントロール shRNA を処理した細胞と同等だった (shCtrl; Figure 3 上図) が、シスプラチン存在下では、shCHIP 細胞のコロニー数が shCtrl 細胞のコロニー数よりも多いことが分かった (Figure 3)。これは、CHIP ノックダウンが細胞のシスプラチン感受性を低下させたことを示唆している。

次に、シスプラチン存在下において生存していた shCHIP 細胞から 3 つのクローンを単離し (cisR-shCHIP, Figure 1、4)、このクローンをを用いてシスプラチンを含む複数の抗がん剤への感受性を検討した。その結果、抗がん剤処理後の cisR-shCHIP クローンの生細胞数が、shCtrl 細胞よりも多いことがわかった (Figure 5、6)。

cisR-shCHIP 細胞の抗がん剤耐性は、Bcl-2 依存的である

cisR-shCHIP 細胞は複数の抗がん剤に対して耐性を示すという Figure 5 の結果から、私は、抗アポトーシス蛋白質として知られる Bcl-2 に注目した。多くの抗がん剤は、経路は異なっている最終的にアポトーシスを誘導することによってがん細胞を死滅させる。このアポトーシスを抑制する Bcl-2 は、多くの抗がん剤に対する耐性獲得原因因子として報告されている (15-18)。そのため、cisR-shCHIP 細胞の Bcl-2 の発現量につ

いて検討を行った。予想した通り、shCtrl 細胞と比較して、cisR-shCHIP 細胞では Bcl-2 の蛋白質、mRNA どちらにおいても発現量が増加していた (Figure 4、7)。そこで、実際に Bcl-2 が cisR-shCHIP 細胞にみられる抗がん剤耐性の原因であるかを確かめるため、cisR-shCHIP 細胞において Bcl-2 のノックダウンを行った (cisR-shCHIP/Bcl-2; Figure 8)。この細胞を用いて抗がん剤への感受性を検討した結果、Bcl-2 の発現低下によって抗がん剤処理後の cisR-shCHIP 細胞の生存細胞数が低下した (Figure 9、10)。

次に、マウス異種間移植モデルを用いた in vivo 腫瘍形成実験を用いて、腫瘍増殖における CHIP と Bcl-2 の関与について検討した (Figure 11)。shCtrl や shBcl-2 細胞を移植したマウスでは、シスプラチン投与により腫瘍重量が減少したが、cisR-shCHIP 細胞を移植したマウスでは、腫瘍重量はシスプラチン投与後も減少が見られなかった。一方で、cisR-shCHIP/Bcl-2 細胞を移植したマウスは、シスプラチン投与によって腫瘍重量の顕著な減少が見られた (Figure 11)。これらの結果を合わせると、CHIP のノックダウンによって増加した抗がん剤耐性細胞の割合は、Bcl-2 の発現依存的だと考えられる。

CHIP の減少は Bcl-2 の発現量の多様性を促進する

次に、CHIP のノックダウンによる Bcl-2 の発現量増加メカニズムについて調べるため、アデノウイルスを用いて、cisR-shCHIP 細胞において CHIP の発現を回復させた。しかし、cisR-shCHIP 細胞において増加した Bcl-2 の発現は、CHIP の発現が回復しても元に戻らなかった (Figure 12)。これは、cisR-shCHIP 細胞における Bcl-2 の高発現が、不可逆なものであることを示している。また、siRNA による一時的な CHIP のノックダウンでは Bcl-2 の発現量に変化が見られなかった (Figure 13)。Figure 12 と 13 の結果から、CHIP は蛋白質分解や転写制御によって直接的に Bcl-2 の発現を変化させ

るのではなく、シスプラチン処理によって、shCHIP細胞の中でも Bcl-2 を高発現した細胞が生き残り、選抜された可能性が考えられる。

そこで、シスプラチンによる抗がん剤耐性細胞選抜の影響を排除するため、シスプラチン非存在下において複数の shCtrl と shCHIP クローンを単離し(Figure 1)、各クローンにおける Bcl-2 と CHIP の mRNA 量を調べた。その結果、shCHIP クローンの中には Bcl-2 の発現が亢進したクローンが存在することがわかった (Figure 14、左図)。このデータを用いてボックスプロットを作製すると、shCtrl クローンと比較して、shCHIP クローンでは、Bcl-2 の発現量が低いものから高いものまで、中央値からの分散が優位に大きいことが示された {Figure 14、右図; F-test、 $p = 2.80 \times 10^{-12}$ (MCF-7)、 $p = 7.28 \times 10^{-6}$ (T47D)}。さらに、CHIP のノックダウン効率の違いによって shCHIP クローン間の Bcl-2 発現量が異なるという可能性を排除するため、CHIP と Bcl-2 の発現量における相関関係の有無を確認したが、有意な相関関係は見られなかった {Figure 15; Spearman correlation analysis、 $r_s = 0.02$ 、 $p = 0.45$ (MCF-7)、 $r_s = 0.22$ 、 $p = 0.095$ (T47D)}。

さらに、抗 Bcl-2 抗体を用いて染色した細胞をフローサイトメーターによって解析し、10,000 個以上の shCtrl もしくは shCHIP 細胞集団における Bcl-2 蛋白質量の多様性について調べた。その結果、shCtrl 細胞と比較して、shCHIP 細胞では細胞間における Bcl-2 蛋白質量の多様性が増加していた (Figure 16; F-test、 $p = 5.70 \times 10^{-147}$)。以上の結果から、CHIP は乳がん細胞株において、Bcl-2 の発現量に生じる多様性を抑えていることが示された。

また、シスプラチン処理後の shCHIP 細胞における Bcl-2 の発現パターンについても検討を行った。シスプラチン処理後に生き残った細胞では、Bcl-2 低発現の細胞集団が減少し、Bcl-2 高発現細胞集団が増加した (Figure 17)。これは、shCHIP 細胞集団内

の Bcl-2 発現の多様性が、Bcl-2 高発現細胞の選抜を介して抗がん剤耐性に寄与していることを示唆している。

ジェネティックな背景の違いが Bcl-2 発現量の多様性増加の原因である

次に、なぜ CHIP のノックダウンによって Bcl-2 発現量の多様性が増加するのかという疑問について取り組んだ。CHIP は本来、HSP90 や HSP70 のようなシャペロン蛋白質と協調して働くことによって、蛋白質品質管理 (protein quality control: PQC) システムを制御することが知られている (9-11, 19)。ミスフォールド蛋白質の凝集体であるアグリソームの染色 (20, 21)を行った結果、shCHIP 細胞ではアグリソームが増加していることから、乳がん細胞においても CHIP が PQC の維持に寄与する事が確認された (Figure 18)。

HSP90 は、*Drosophila melanogaster* や *Arabidopsis thaliana* の発生過程において、個体間に存在するジェネティックやエピジェネティックな違いを隠し、表現型を均一にすることが報告されている (22-24)。MCF-7 や T47D は、クローン化されていないヒト乳がん由来細胞株であり、ジェネティックな背景に違いがあることが報告されている (25-27)ことから、それまで隠されていた細胞間のジェネティックやエピジェネティックな違いが、CHIP の減少によって露わになった可能性が考えられる。この可能性について検討するため、MCF-7 細胞から 1 細胞由来のクローンを単離し (sc-MCF-7)、shCHIP 細胞を作成した (Figure 1, 19)。さらにこの shCtrl、shCHIP sc-MCF-7 細胞から複数のクローンを単離し、各クローンにおける Bcl-2 mRNA 量を調べた。その結果、クローン化していない MCF-7 細胞を用いた結果 (Figure 14) と対照的に、shCtrl、shCHIP sc-MCF-7 クローンでは、クローン間における Bcl-2 発現量の多様性に有意な差が認められなかった {Figure 20; F-test、 $p = 0.52$ (sc-MCF-7 #1)、 $p = 0.83$ (sc-MCF-7 #2)}。さらに、CHIP のノックダウンは、sc-MCF-7 細胞間における Bcl-2

蛋白質レベルでの多様性にも影響を与えなかった (Figure 21)。また、シスプラチンへの感受性の変化についても検討を行い、sc-MCF-7 細胞は、CHIP が減少してもシスプラチン存在下でのコロニー形成能が亢進しないことが分かった (Figure 22)。これらの結果から、ジェネティック、エピジェネティックな背景が均一な乳がん細胞集団では、CHIP の発現が減少しても、Bcl-2 の発現量やシスプラチン耐性能が変化しないことが示された。

次に、HSP90 での報告のように、ジェネティックな背景の違いが CHIP のノックダウンによる Bcl-2 発現量の多様性増加の原因となるのかを調べるため、shCtrl、shCHIP sc-MCF-7 細胞に対して変異原である *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) (28) を処理し、再びジェネティックな違いを生じさせたうえで、Bcl-2 発現の多様性を検討した。その結果、shCHIP sc-MCF-7 細胞では、ENU 処理回数依存的に、Bcl-2 発現量の多様性が増加した (Figure 23)。また、sc-MCF-7 細胞にあらかじめ ENU を処理した後、ENU 非存在下で siRNA を用いて CHIP を減少させた。siRNA 処理後の継時的な Bcl-2 発現量の多様性の変化を調べたところ、CHIP のノックダウン後、時間依存的に Bcl-2 発現量の多様性が増加することがわかった (Figure 24)。これらの結果から、細胞ごとのジェネティックな背景の違いが、MCF-7 細胞における Bcl-2 発現の多様性増加の原因だと考えられる。ENU はもともと遺伝子変異を導入するために用いられてきたが、間接的な影響によってエピジェネティックな遺伝子制御に影響を与える可能性もある。したがって現段階では、エピジェネティックな背景の違いが Bcl-2 発現量に及ぼす影響も排除することは出来ない。

CHIP の減少はジェネティックな背景の違い依存的に CSC の性質を促進させる

これまで Bcl-2 のみに注目した解析を行ってきたため、次に、DNA マイクロアレイを用いて、CHIP の減少が遺伝子発現全体に与える影響について検討した。ある遺伝子

の発現量について、1細胞での発現量が、細胞集団での発現量（全細胞の発現量の平均値）からどれだけ異なるか。つまり、遺伝子発現量において1細胞ごとの個性がどれだけ強いのか、またそれに対してCHIPノックダウンがどのように影響するのかを検討するため、shCtrl、shCHIPクローン（1細胞における発現量を表す）と、クローンを単離する前の各親細胞（shCtrl、shCHIP細胞：細胞集団における発現量を表す）の遺伝子発現の違いを調べた。得られたデータのスキッタープロットから、クローンと親細胞間の遺伝子発現量の違いはshCtrl細胞よりもshCHIP細胞の方が大きいことが分かった（Figure 25a）。さらにクローンと親細胞で、遺伝子発現量に2倍以上の違いがあるプローブの数は、shCtrl細胞よりもshCHIP細胞の方が有意に多かった（Figure 25b）。このような結果から、CHIPの減少はBcl-2のみならず、様々な遺伝子の発現量の多様性に影響を与えることが示唆された。

F-testによってクローンごとのマイクロアレイデータを比較した結果、shCtrlクローンと比較して、shCHIPクローン間では3921遺伝子の発現量の多様性が有意に増加していた（ $p \leq 0.1$ ）。また、この3921遺伝子には、CD44 (29)や、NANOG (30)、KLF4 (31)、SOX2 (32)のように、CSCへの関与が報告されているものが含まれていた（Table 1）。そのため、過去の報告においてCSC（CD44^{High}/CD24^{Low}）とnon-CSCを用いて行われたマイクロアレイデータ（GSE36643）(33)を取得し、発現量が1.5倍以上変化した2347遺伝子を抽出、shCHIPクローン間で発現量の多様性が増加した3921遺伝子と比較した。すると、両者の間で673遺伝子が共通していることがわかった（Figure 26）。

CHIPの減少によって発現の多様性が変化する遺伝子と、CSCに関連する因子には共通するものが多くみられたことから、shCHIP細胞ではCSCの割合が変化している可能性を考えた。CSCは、正常幹細胞のように自己増殖能や分化能を有するがん細胞であり（7, 34）、腫瘍イニシエーション能や高い転移能、薬剤排出能を持つと言われており（34-36）。このような性質のため、CSCは抗がん剤耐性や、再発に寄与し、がんの

根治を妨げる (34, 37, 38)。CSC の指標としては、スフィア形成能や、side population (SP) 細胞の割合、腫瘍イニシエーション能の評価が用いられている (35, 39-41)。そこで、これらの実験を行い、CHIP ノックダウンが CSC 様形質に与える影響を検討した。その結果、shCHIP 細胞は shCtrl 細胞と比較してスフィア形成能が亢進することがわかった (Figure 27)。この時形成されたスフィアを回収し、CSC 関連因子の発現量を検討したところ、shCtrl 細胞のスフィアと比較して、shCHIP 細胞から形成されたスフィアでは、*NANOG* (30) や *CD133* (30, 42, 43) といった CSC 関連因子の発現が亢進していた (Figure 28)。SP の実験においても、shCHIP 細胞では SP 細胞の割合が多いことが示された (Figure 29)。加えて、限界希釈異種間移植実験から、shCHIP 細胞が shCtrl 細胞よりも高い腫瘍イニシエーション能を持つことが示された (Table 2)。これらのすべてのデータは、CHIP の減少が乳がん細胞間で CSC の性質を変化させるという予測を強く支持するものである。

さらに、sc-MCF-7 細胞を用いた場合には、スフィア形成実験と SP 実験どちらの結果においても、CHIP のノックダウンによる CSC の増加を示さなかった (Figure 30, 31)。対して、ENU を処理した sc-MCF-7 細胞では、CHIP のノックダウンによってスフィア形成能の亢進が見られた (Figure 32)。以上の結果から、CHIP は、乳がん細胞間におけるジェネティックな背景の違いを隠すことによって、CSC の増加を妨げていると考えられる。

考察

本研究において得られた結果から、CHIP が乳がん細胞間のジェネティックな背景の違いを隠すことが示唆された。ジェネティックな変異は、蛋白質の発現増加と同時に、構造の変化したポリペプチドを増加させ、蛋白質の品質を低下させる (44)。ジェネティックな背景の違いとシャペロン蛋白質、表現型の多様性の関係については、*D. melanogaster* や *A. thaliana* の発生と成長の過程において、HSP90 がシャペロンとしての機能によって、ジェネティックな背景の違いを隠すことが報告されている (22, 23)。CHIP は HSP90 や HSP70 のコシャペロンであり、ユビキチン E3 リガーゼとしてミスフォールド蛋白質をユビキチン化する (45)だけでなく、CHIP 自身も変性蛋白質に結合するシャペロン活性を持ち、変性蛋白質の凝集を防ぐことが報告されている (46)。そのため CHIP は、蛋白質の分解と折り畳みの協調したネットワークに寄与することによって、PQC を維持していると考えられる。本研究でも、CHIP が乳がん細胞において PQC に寄与することを確認している。得られた結果と過去の報告を併せると、がん細胞における CHIP による細胞間の不均一性に対する緩衝作用は、ユビキチン E3 リガーゼ活性と、PQC システムにおけるシャペロン制御活性のどちらか、もしくは両方を必要とすると予想される。また、CHIP ががん細胞だけでなく、ヒトの発生や成長の過程においても、細胞間におけるジェネティックな背景の違いを緩衝している可能性も考えられる。

本研究では、Bcl-2 発現の多様性亢進に関与する因子など、CHIP がジェネティックな違いを隠している遺伝子を明らかにできなかった。Bcl-2 の発現量は、3' と 5' 非翻訳領域における mRNA の安定性 (47, 48) や、転写量の調節 (49-55) によって制御されることが報告されている。cisR-shCHIP 細胞において、Bcl-2 の転写量が亢進していることを示すデータが得られているため、現段階では転写制御の変化が Bcl-2 発現量の多

様性の原因の一つであると考えている。これまでに、p53 (49) や、WT-1 (50)、CREB (51)、NF- κ B (52)、E2F-1 (53)、AP-2 (54)、BP1 (55) など、数多くの Bcl-2 転写制御因子が報告されている。乳がんも含め、がん細胞にはジェネティックな変異が蓄積しており、遺伝子発現に影響を与えている (56, 57)。そのため、CHIP によってジェネティックな変異が緩衝され、Bcl-2 発現に影響する因子 (群) は、Bcl-2 の発現制御因子の中に存在する可能性がある。現在のところ、このような因子の特定には至っていないため、この因子を同定することが今後の目標である。

多くのがんは表現型的、機能的に不均一な細胞集団によって構成される (5)。このがん細胞間の不均一性は、様々な経路によって引き起こされる (6)。不均一性の主な原因は、ジェネティックな違い (6) と、CSC の分化であると考えられている (7, 58)。しかし、がん細胞集団の表現型不均一性を制御する特定の因子は、これまでに報告されていない。本研究は、CHIP がジェネティックな背景の違い依存的な遺伝子発現量の多様性を緩衝することによって、抗がん剤耐性細胞や CSC を減少させることを示した。これまでの報告と本研究での結果から、ジェネティックな背景の違いにより誘導される表現型不均一性の程度決定に、蛋白質品質管理システムが寄与することが示唆された (Figure 33)。

現在蓄積しつつある様々な証拠から、多くのがんにおける不均一性が、治療への反応やがんの進行に関係していることが示されてきている (2, 4, 59)。そのため、がんの根治を実現させるためには、不均一性の拡大を妨げることが必要となる。乳がん細胞を用いた本研究において、CHIP の減少はジェネティックな背景の違い依存的に Bcl-2 発現量の多様性を増加させ、Bcl-2 高発現細胞の選抜を介して抗がん剤耐性に寄与することが示された。また、CHIP の減少によって、乳がん細胞において CSC の割合が増加することもわかった。近年の報告は、CSC が、がんの進行や再発に関与することを示唆している (60, 61) ため、本研究の結果は、CHIP の発現量の低下を防止することによ

って、ジェネティックな背景の違いや CSC の性質に由来する不均一性の拡大を妨げ、乳がんの進行を止める、という新たな治療法につながる可能性を示している。さらに臨床研究の結果から、腫瘍組織における CHIP の発現量減少が、乳がん患者のがんの悪性度 (12) や全生存率 (13) に関与することが示唆されている。そのため、今後さらに CHIP と乳がんの関係についての解析を進めることによって、CHIP を指標とした乳がん患者の予後予測や、CHIP によるがん不均一性を標的とした新規治療法の開発など、乳がんの新たな治療戦略に繋がっていくことが期待される。

材料及び実験手法

細胞培養及び薬剤処理

MCF-7、T47D 細胞は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal bovine serum (FBS) とペニシリン溶液を添加した培地中で培養した。shCtrl、sh*CHIP*^{sc}-MCF-7 #1 細胞に対して、週に 1 回 1 µg/ml *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU; Sigma-Aldrich) を処理した。

RNA 干渉法

RNA 干渉のため、レトロウイルス発現システムを使用した。GP2-293 細胞 (Clontech) に、pVSV-G ベクターと、*CHIP*、*Bcl-2*、*LacZ* (control) もしくは *luciferase* (control) の標的配列を導入した pSINsi-hU6 (Takara) あるいは pSUPER-retro (OligoEngine) ベクターを共にトランスフェクションした。MCF-7、T47D 細胞を、8 µg/ml ポリブレン存在下でこれらのレトロウイルス液と共に培養し、感染から 24 時間後に、ウイルス含有培地から新たな 10%FBS 含有 DMEM 培地に交換した。感染した細胞から、1 mg/ml G418 もしくは 1 µg/ml puromycin によって遺伝子の導入された細胞のみを選抜した。標的とした遺伝子配列は以下に示す。

<i>CHIP</i>	5'-gcacgacaagtacatggcgga-3'
<i>Bcl-2</i>	5'-tggatgactgagtacctaag-3'
<i>LacZ</i>	5'-gctacacaaatcagcgatt-3'
<i>luciferase</i>	5'-gaagctgcgcggtggtgtt-3'

siRNA トランスフェクション

luciferase (control; Invitrogen) もしくは、*CHIP* を標的とした siRNA を

Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用い、製造者のプロトコールに従って細胞へ導入した。siRNA が標的とする遺伝子配列を以下に示す。

si *CHIP*#1 5'- ggcaatcgtctgttcgtgggccgaa -3'

si *CHIP*#2 5'- ccagcgctcttcgaatcgcaagaa -3'

免疫ブロット法

細胞を 0.5% Triton buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 150 mM NaCl、 0.5 mM EDTA、 0.5% TritonX-100]によって溶解し、抽出蛋白質を SDS-PAGE によって分離、PVDF メンブレン (Millipore) に移し、図中に示した各抗体によって検出した。本研究中において免疫ブロット法に使用した抗体を以下に示す。

マウスモノクローナル抗体

human β -Actin (1:1000; Santa Cruz、 clone C4)

human Bcl-2 (1:1000; BD Biosciences、 clone 7)

ラットモノクローナル抗体

human CHIP (1:250; Green Space Biomed、 Japan).

シスプラチン耐性アッセイ

MCF-7 細胞を 10-cm 培養ディッシュに 6.0×10^3 cells 播種し、24 時間後、5 μ M シスプラチン (LKT Laboratories) を処理した。10 日間培養し、生き残った細胞が形成したコロニーを、メタノールに溶解した 2%クリスタルバイオレット (Nacalai Tesque) で固定・染色し、コロニー数を計測した。

T47D 細胞を 10-cm 培養ディッシュに 8.0×10^3 cells 播種し、48 時間後、5 μ M シスプラチンを処理した。2 週間培養し、生き残った細胞が形成したコロニーを、メタノールに溶解した 2%クリスタルバイオレットで固定・染色し、コロニー数を計測した。

抗がん剤耐性アッセイ

MCF-7、T47D 細胞を 12 穴培養プレートに 1.0×10^5 cells/ml で播種した。MCF-7 に対しては、播種から 24 時間後に 75 μ M シスプラチン (LKT Laboratories)、100 nM パクリタキセル (Wako)、25 μ M エトポシド (Calbiochem)、750 nM エピルビシン (Pfizer) を処理した。T47D に対しては、播種から 48 時間後に 75 μ M シスプラチン、750 nM パクリタキセル、2.5 μ M エトポシド、250nM エピルビシンを処理した。抗がん剤処理から 48 時間後、細胞を 0.4%トリパンブルーによって染色し、生細胞数を Countess™ (Invitrogen) によって計測した。

リアルタイム RT-PCR

細胞を 1 ml の Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque) によって溶解し、全 RNA を製造者のプロトコールに従って溶出した後、37°C で 30 分間 DNase (Promega) を処理した。全 RNA から、Revatrac reverse transcriptase (Toyobo) とランダムプライマーを用いて cDNA を合成し、この cDNA を Thermal Cycler Dice™ TP800 (Takara) と SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) を用いたリアルタイム PCR によって増幅し、cDNA 量を定量した。各遺伝子の mRNA 量は、PPIA の mRNA 量を用いて補正した。リアルタイム PCR に用いたプライマーを以下に示す。

CHIP 5'-gcagcgtgtgggtcatttt-3'、5'-tagtcctccaccagccatt-3'

Bcl-2 5'-ctgggaatcgatctggaaatcc-3'、5'-tgcataaggcaacgatcccatc-3'

PPIA 5'-acgtggtataaaaagggcgaggag-3'、5'-tcaccaccctgacacataaacctg-3'

マウス異種間移植モデルを用いた in vivo 腫瘍形成実験

単層培養した MCF-7 細胞をトリプシン処理し、 1.0×10^8 cells/ml になるようにマトリゲル (BD Biosciences) に懸濁し CLEA Japan から購入した 4 週齢の

BALB/cAJcl-nu/nu メスマウスの両脇腹の皮下に 1.0×10^7 cells (0.1 ml) を注入した。マウスは無菌環境下で飼育した。腫瘍がおよそ 100 mm³に達した時から、2 週間ごとに腹腔内投与によってシスプラチン (4 mg/kg) もしくは溶媒である phosphate-buffered saline (PBS; Nissui) を投与した。53 日後、すべてのマウスを屠殺し、腫瘍回収後、腫瘍重量を計測した。動物実験は、施設のガイドラインに則って行われた。

アデノウイルスによる遺伝子過剰発現

CHIP の過剰発現を行うため、ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) を製造者のプロトコールに従って使用した。CHIP 発現用アデノウイルス液を作製するため、HEK293 細胞に pAd/CMV/V5-DEST ベクターと全長の CHIP (Ad-CHIP) もしくは GFP (Ad-GFP) の配列を共にトランスフェクションした。このウイルス液を添加した培地中で MCF-7 細胞を培養し、感染から 48 時間後に蛋白質を抽出した。

フローサイトメトリー

細胞の透過・固定を行うため、FACS Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences) を室温 (RT) にて 10 分間処理し、PBS によって希釈した 0.5% BSA で洗浄、RT にて暗所で 30 分間 FITC 結合抗 Bcl-2 抗体 (BD Biosciences、clone 100) と反応させた。FACS Aria (BD Biosciences) を用いて、この細胞の Bcl-2 の蛋白質量を分析した。FACS によって集めたデータは、FlowJo (Tree Star) を用いて解析した。

アグリソーム染色

細胞内のアグリソームを、Raju (21) のプロトコールに従って ProteoStat[®] Aggresome

dye (Enzo Life Sciences) を用いて染色した。4%パラホルムアルデヒドをRTで30分間処理することで細胞を固定し、その後1 × assay bufferで希釈した0.5% Triton X-100を用いて氷上で30分間細胞膜の透過処理を行った。1 × assay bufferで細胞を2回洗浄した後、ProteoStat® Aggresome dyeをRTで30分間反応させ染色した。染色後、1 × assay bufferで洗浄した。染色した細胞は、LSM 700 Confocal microscope (Zeiss) を用いて観察し、イメージを×40 対物レンズ、レッドフィルターを用いて撮影、アグリソームを形成している細胞数を計測した。各サンプルにおいて、少なくとも150細胞を計測した。

マイクロアレイ

FastPure RNA Kit (Takara) を用いて全RNAを抽出し、このRNA (100 ng) を用いてlabeled aRNA を合成した。Gene Chip 3'IVT Expression Kit (Affymetrix) を製造者のプロトコールに従って使用し、aRNAを断片化した。プロトコールに従い、断片化されたlabeled aRNA 12.5 µgを用いてhybridization mixを作製し、U133 Plus 2.0 GeneChips (Affymetrix) にハイブリダイズした。このチップをGeneChip Fluidics Station (Affymetrix) によって洗浄・染色し、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) によってスキャンした。生データはGCOS software ver1.0を用いて取得し、GeneSpring ver.12.1 (Agilent Technologies) を使って解析した。得られたデータセットは、NCBIのGene Expression Omnibus (GEO) に登録した (登録番号: GSE49349)。

スフィア形成実験

MCF-7 細胞を、6 穴超低接着培養プレート (Corning Costar) に 1000 cells/well で播種し、DMEM/Ham's F-12 (Nacalai Tesque) に 0.4% BSA、5 µg/ml bovine insulin (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml EGF (Peprotech)、1 × B27 supplement (Gibco) を添加し

た培地中で培養した。7 日後、直径 100 μm 以上の大きさに成長したスフィア数を BioZero BZ8000 顕微鏡 (Keyence) を用いて計測した。T47D 細胞は、6 穴超低接着培養プレート (Corning Costar) に 5000 cells/well で播種し、CnT-27 medium (Cellntec) 中で培養した。10 日後、直径 100 μm 以上の大きさに成長したスフィア数を計測した。

Side population (SP) 実験

1×10^6 細胞を 970 μl の 2% FBS と 10 mM HEPES (pH 7.4) を添加した Hanks' balanced salt solution (HBSS) に懸濁した後、17.5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) を加えて 37 °C で 90 分間反応させた。PBS で希釈した 2% FBS で洗浄し、2%FBS、10 mM HEPES (pH 7.4)、2 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich) を含む HBSS に再懸濁した。1 μM Fumitremorgin C (FTC) は、SP 領域を確認するために用いており、Hoechst 33342 を添加する前に細胞に処理し、37 °C で 10 分間反応させた。SP 細胞は、FACS Aria を用いて解析した。

限界希釈移植実験

単層培養した MCF-7 細胞をトリプシン処理し、 1.0×10^6 から 5.0×10^2 cells/ml になるようにマトリゲルに懸濁した。Charles River Laboratories から購入した 5 週齢の NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J (NOD/SCID) メスマウスの両脇腹の皮下に、0.1 ml の細胞懸濁マトリゲルを注入した。マウスは無菌環境で飼育した。6 週間後、すべてのマウスを屠殺し、腫瘍を回収した。動物実験は、施設のガイドラインに則って行われた。

統計解析

腫瘍重量 (Figure 11)、生細胞及びコロニー数 (Figures 3、 5、 9、 22)、mRNA 量 (Figures 7、 13a、 28)、スフィア形成能 (Figures 27、 30、 32)、アグリソーム

形成(Figure 18)、分散の変化したプローブ数 (Figure 25b) の比較には、Student's t-testを使用した。*Bcl-2*と *CHIP*の発現量の相関関係 (Figure 15) を検討するために、Spearman's rank correlation coefficient (r_s と p -value を示した) を使用した。特定の遺伝子の mRNA 量や蛋白質量の分散 (Figures 14、16、20、21、23、24、Table 1) を比較するために、Statistical F-test (F-value と p -value を示した) を用いた。標準偏差とサンプル数は、それぞれ S.D.、n.と省略した形で示している。

出典

1. Ferlay J, *et al.* (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127(12):2893-2917.
2. Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation* 117(11):3155-3163.
3. Heng HH, *et al.* (2009) Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective. *Journal of cellular physiology* 220(3):538-547.
4. Lambert G, *et al.* (2011) An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tissues. *Nature reviews. Cancer* 11(5):375-382.
5. Michor F & Polyak K (2010) The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer prevention research* 3(11):1361-1364.
6. Magee JA, Piskounova E, & Morrison SJ (2012) Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell* 21(3):283-296.
7. Visvader JE & Lindeman GJ (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell stem cell* 10(6):717-728.
8. Ballinger CA, *et al.* (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Molecular and cellular biology* 19(6):4535-4545.
9. Jiang J, *et al.* (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase:

- identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *The Journal of biological chemistry* 276(46):42938-42944.
10. Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, & Tanaka K (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO reports* 2(12):1133-1138.
 11. Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426(6968):895-899.
 12. Kajiro M, *et al.* (2009) The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature cell biology* 11(3):312-319.
 13. Patani N, Jiang W, Newbold R, & Mokbel K (2010) Prognostic implications of carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein and lysyl-oxidase expression in human breast cancer. *Journal of carcinogenesis* 9:9.
 14. Drewinko B, Brown BW, & Gottlieb JA (1973) The effect of cis-diamminedichloroplatinum (II) on cultured human lymphoma cells and its therapeutic implications. *Cancer research* 33(12):3091-3095.
 15. Rudin CM, *et al.* (2003) Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer research* 63(2):312-318.
 16. Davis JM, *et al.* (2003) Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(3):1161-1170.
 17. Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, & Vasconcelos MH (2004) Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer gene*

- therapy* 11(5):309-316.
18. Tabuchi Y, *et al.* (2009) Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *International journal of oncology* 34(2):313-319.
 19. Kampinga HH, Kanon B, Salomons FA, Kabakov AE, & Patterson C (2003) Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 23(14):4948-4958.
 20. Shen D, *et al.* (2011) Novel cell- and tissue-based assays for detecting misfolded and aggregated protein accumulation within aggresomes and inclusion bodies. *Cell biochemistry and biophysics* 60(3):173-185.
 21. Raju I, Kumarasamy A, & Abraham EC (2011) Multiple aggregates and aggresomes of C-terminal truncated human alphaA-crystallins in mammalian cells and protection by alphaB-crystallin. *PloS one* 6(5):e19876.
 22. Rutherford SL & Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396(6709):336-342.
 23. Queitsch C, Sangster TA, & Lindquist S (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417(6889):618-624.
 24. Sollars V, *et al.* (2003) Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nature genetics* 33(1):70-74.
 25. Papendorp JT, Schatz RW, Soto AM, & Sonnenschein C (1985) On the role of 17 alpha-estradiol and 17 beta-estradiol in the proliferation of MCF7 and T47D-A11 human breast tumor cells. *Journal of cellular physiology*

- 125(3):591-595.
26. Butler WB, Berlinski PJ, Hillman RM, Kelsey WH, & Toenniges MM (1986) Relation of in vitro properties to tumorigenicity for a series of sublines of the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer research* 46(12 Pt 1):6339-6348.
 27. Resnicoff M, *et al.* (1987) Subpopulations of MCF7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: a model to analyze the heterogeneity of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(20):7295-7299.
 28. McDiarmid HM, Douglas GR, Coomber BL, & Josephy PD (2001) Epithelial and fibroblast cell lines cultured from the transgenic BigBlue rat: an in vitro mutagenesis assay. *Mutation research* 497(1-2):39-47.
 29. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, & Struhl K (2011) Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(4):1397-1402.
 30. Jeter CR, *et al.* (2011) NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30(36):3833-3845.
 31. Yu F, *et al.* (2011) Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* 30(18):2161-2172.
 32. Yang J, *et al.* (2013) Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling

- pathway. *Stem cells* 31(2):248-258.
33. Battula VL, *et al.* (2012) Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 122(6):2066-2078.
 34. Dean M (2009) ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 14(1):3-9.
 35. Al-Hajj M & Clarke MF (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23(43):7274-7282.
 36. Li F, Tiede B, Massague J, & Kang Y (2007) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell research* 17(1):3-14.
 37. Jones RJ (2009) Cancer stem cells-clinical relevance. *Journal of molecular medicine* 87(11):1105-1110.
 38. Eppert K, *et al.* (2011) Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature medicine* 17(9):1086-1093.
 39. Cariati M, *et al.* (2008) Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122(2):298-304.
 40. Patrawala L, *et al.* (2005) Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer research* 65(14):6207-6219.
 41. Wu C & Alman BA (2008) Side population cells in human cancers. *Cancer letters* 268(1):1-9.
 42. Wright MH, *et al.* (2008) Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻

- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast cancer research : BCR* 10(1):R10.
43. Cheng JX, Liu BL, & Zhang X (2009) How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer treatment reviews* 35(5):403-408.
 44. Calderwood SK (2013) Tumor heterogeneity, clonal evolution, and therapy resistance: an opportunity for multitargeting therapy. *Discovery medicine* 15(82):188-194.
 45. McClellan AJ & Frydman J (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nature cell biology* 3(2):E51-53.
 46. Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, & Cyr DM (2007) Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *The Journal of biological chemistry* 282(31):22267-22277.
 47. Young RL & Korsmeyer SJ (1993) A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Molecular and cellular biology* 13(6):3686-3697.
 48. Lee JH, *et al.* (2004) CA repeats in the 3'-untranslated region of bcl-2 mRNA mediate constitutive decay of bcl-2 mRNA. *The Journal of biological chemistry* 279(41):42758-42764.
 49. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, & Reed JC (1994) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer research* 54(12):3131-3135.
 50. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ, 3rd, & Saunders GF (1995) Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer research* 55(22):5386-5389.

51. Wilson BE, Mochon E, & Boxer LM (1996) Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Molecular and cellular biology* 16(10):5546-5556.
52. Kurland JF, *et al.* (2001) NF-kappaB1 (p50) homodimers contribute to transcription of the bcl-2 oncogene. *The Journal of biological chemistry* 276(48):45380-45386.
53. Gomez-Manzano C, *et al.* (2001) Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2. *Cancer research* 61(18):6693-6697.
54. Decary S, *et al.* (2002) The retinoblastoma protein binds the promoter of the survival gene bcl-2 and regulates its transcription in epithelial cells through transcription factor AP-2. *Molecular and cellular biology* 22(22):7877-7888.
55. Stevenson HS, *et al.* (2007) BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNFalpha-induced cell death in MCF7 breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 9(5):R60.
56. Banerji S, *et al.* (2012) Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486(7403):405-409.
57. Curtis C, *et al.* (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486(7403):346-352.
58. Tang DG (2012) Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell research* 22(3):457-472.
59. Ding L, *et al.* (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481(7382):506-510.
60. Song W, *et al.* (2008) Expression and clinical significance of the stem cell

marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical practice* 62(8):1212-1218.

61. Dean M, Fojo T, & Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews. Cancer* 5(4):275-284.

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官としてご指導いただきました筑波大学大学院生命環境系准教授 木村圭志先生に謹んでお礼申し上げます。

そして有益かつ、親切なご指導、ご助言を頂いた筑波大学 柳澤純先生、仲島由佳先生、岸本恕征先生、和久剛さん、村山明子先生、日吉裕美先生、古米良平さん、実験の補佐をしてくださった森下環さん、林優樹さんに厚く御礼申し上げます。

また、CSC に関する実験、ディスカッションにご協力いただいた、国立医薬品食品衛生研究所 諫田泰成先生、平田尚也さんに深く感謝申し上げます。

最後に、研究のみならず日頃から様々なことでお世話になりました、木村研究室の皆様から心から感謝申し上げます。

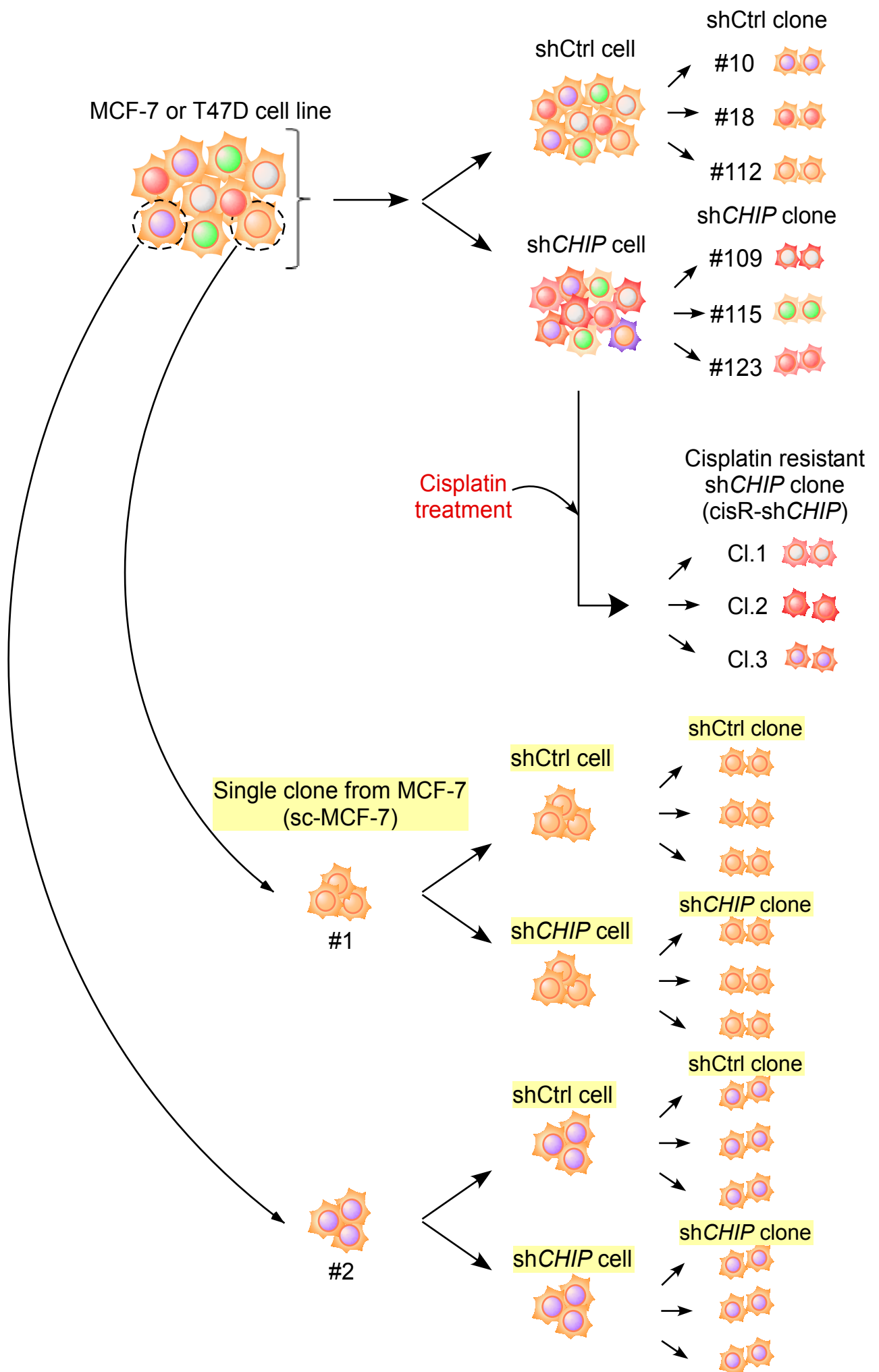


Figure 1. 本研究において作製した細胞の実験デザイン。

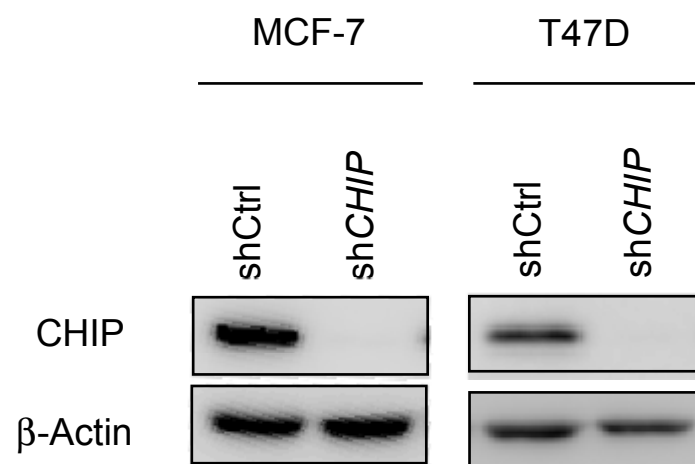


Figure 2. shCHIP細胞におけるCHIPの発現量。MCF-7とT47D細胞に、LacZ (shCtrl) とCHIP (shCHIP) に対するshRNAを導入した後、CHIPの蛋白質量を調べた。

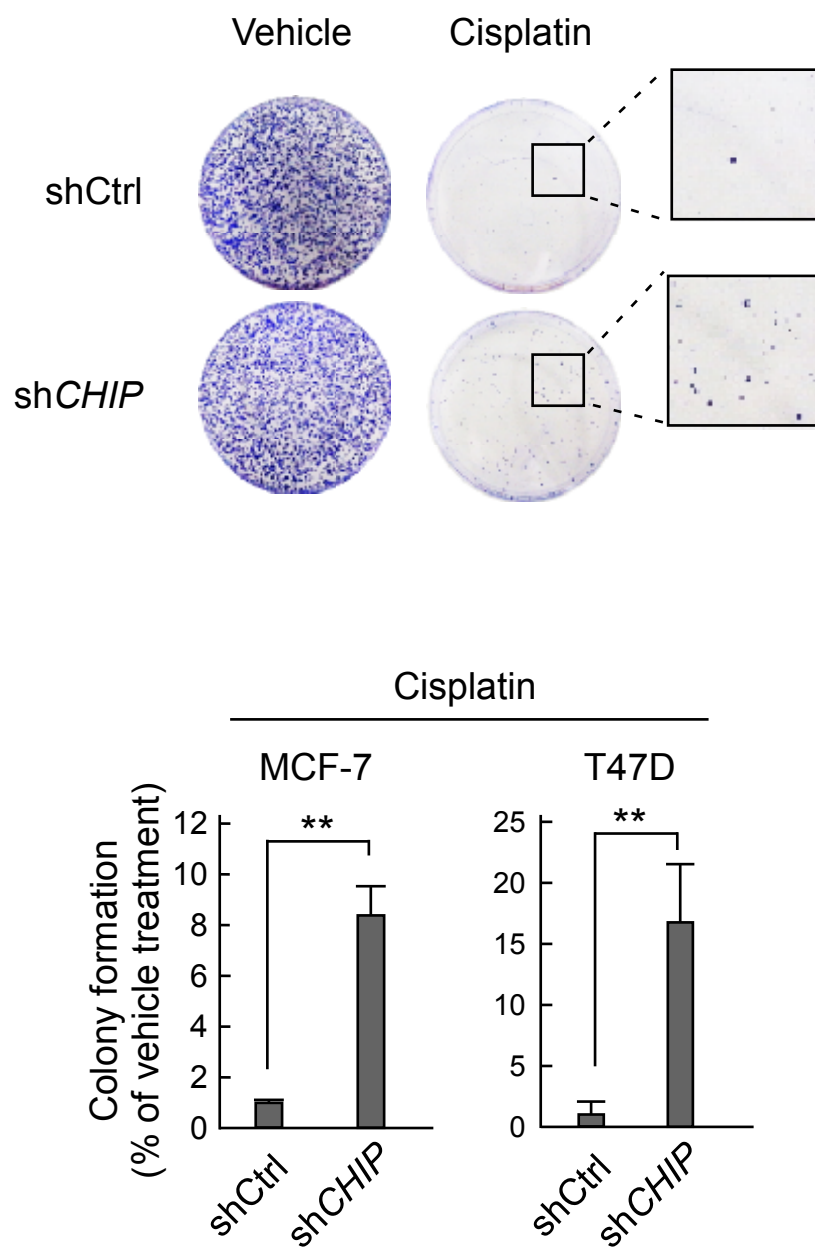


Figure 3. シスプラチン存在下におけるshCHIP細胞のコロニー形成能。5 μ Mシスプラチン含有培地で上記の細胞を培養し、10日後に形成されたコロニー数を計測した。コロニーはクリスタルバイオレットを用いて染色し、MCF-7のコロニーの写真を示した（上図）。エラーバーはS.D.を表している。** $p < 0.01$ 、 $n = 3$ 。

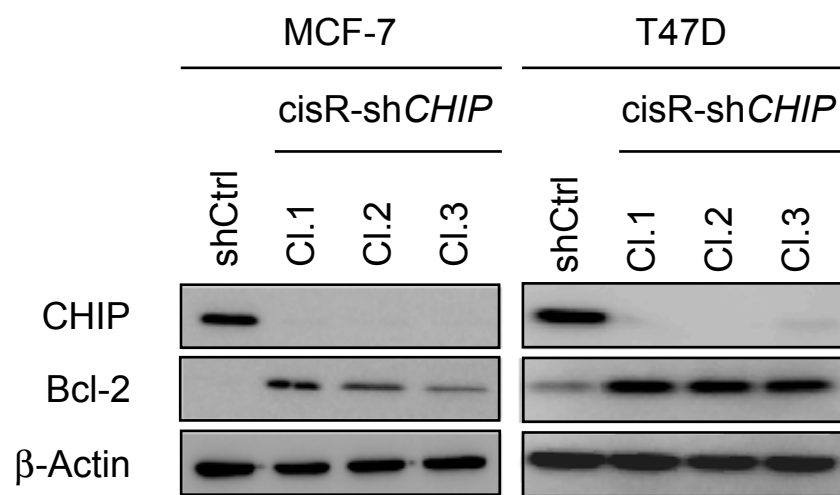


Figure 4. cisR-shCHIP細胞のCHIPとBcl-2蛋白質量。シスプラチンを処理後生存していたshCHIP細胞からcisR-shCHIPクローンを単離し、シスプラチン未処理のshCtrl細胞をコントロールとして使用した。各細胞から蛋白質を抽出し、CHIPとBcl-2の蛋白質量を調べた。

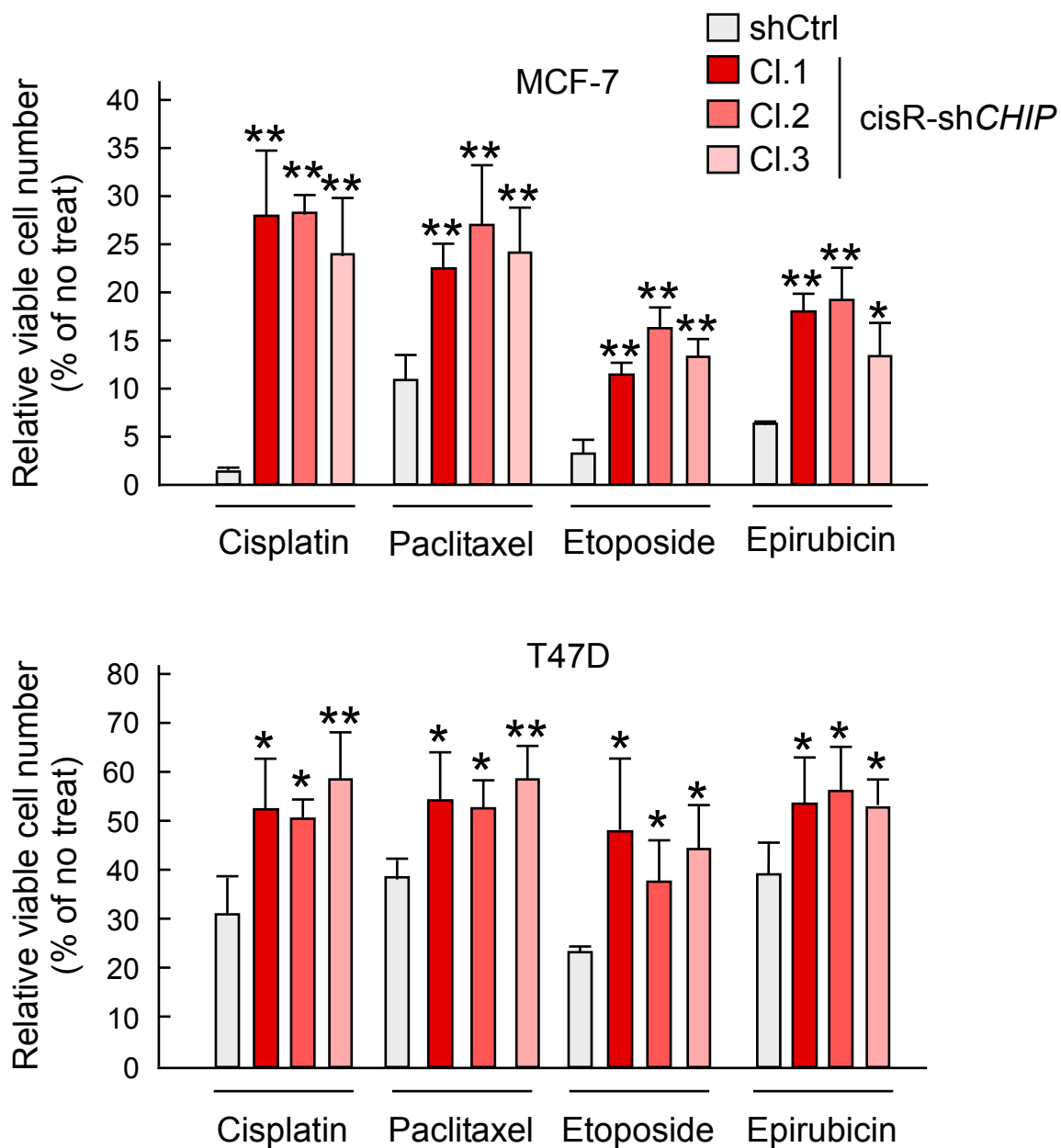


Figure5. 抗がん剤処理時のcisR-shCHIP細胞の生細胞数。図中の薬剤を、各細胞に処理し、トリパンブルー染色を用いて48時間後の生細胞数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、 $n \geq 3$ 。

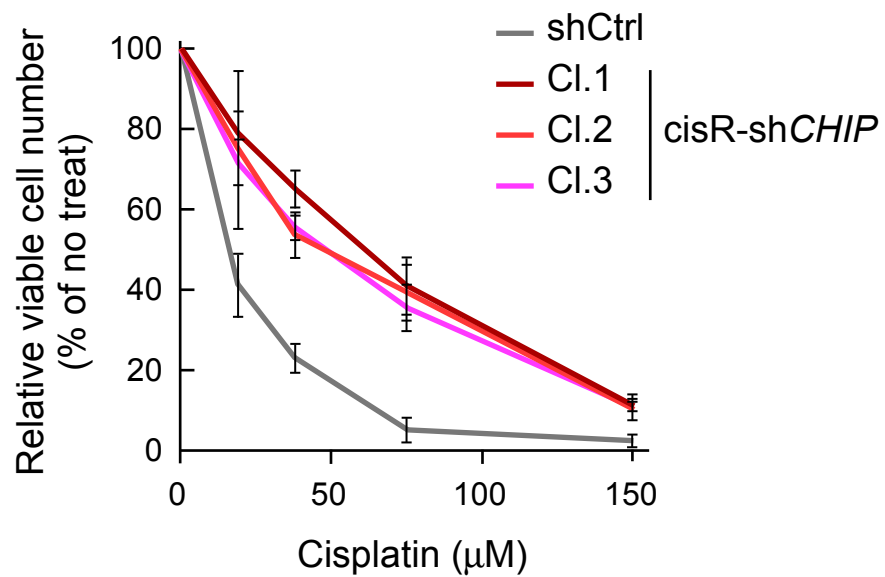


Figure 6. cisR-shCHIP細胞のシスプラチンに対する用量反応曲線。shCtrl、cisR-shCHIP細胞に19、38、75、150 μ Mのシスプラチン进行处理し、トリパンプルー染色を用いて48時間後の生細胞数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。n = 4。

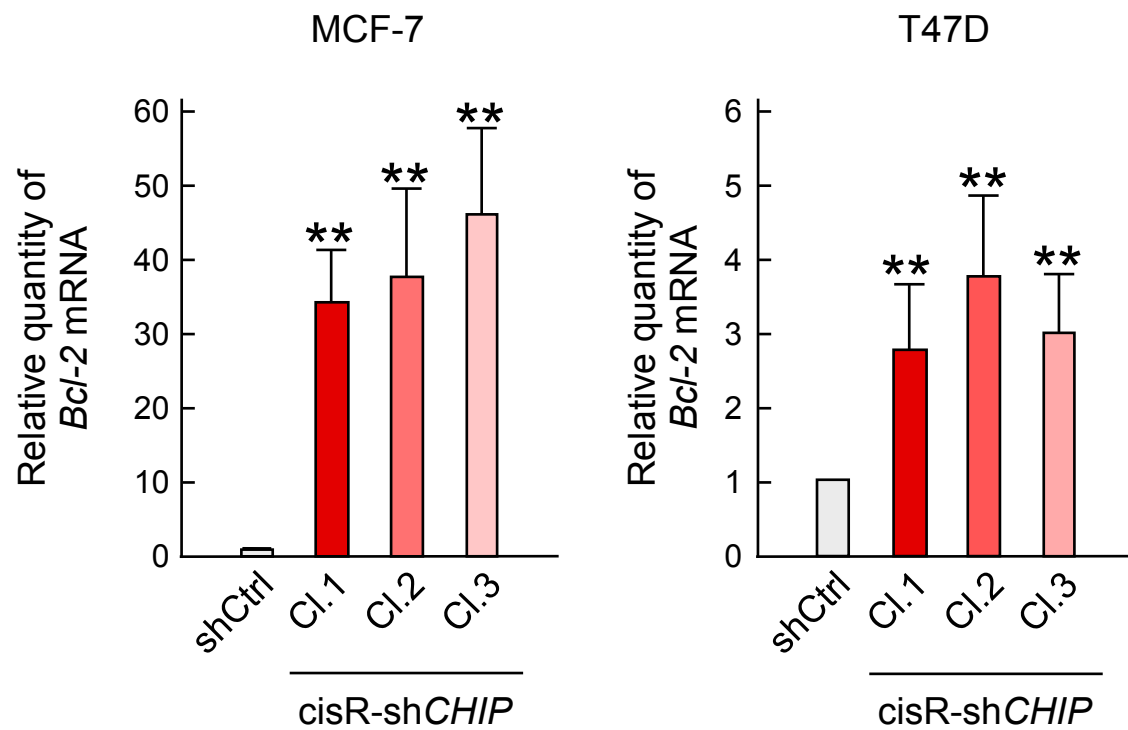


Figure 7. cisR-shCHIP細胞のBcl-2 mRNA量。shCtrl、cisR-shCHIP MCF-7およびT47D細胞からRNAを抽出し、Bcl-2 mRNA量を調べた。エラーバーはS.D.を表している。** $p < 0.01$ 、 $n = 3$ (MCF-7)、 $n = 4$ (T47D)。

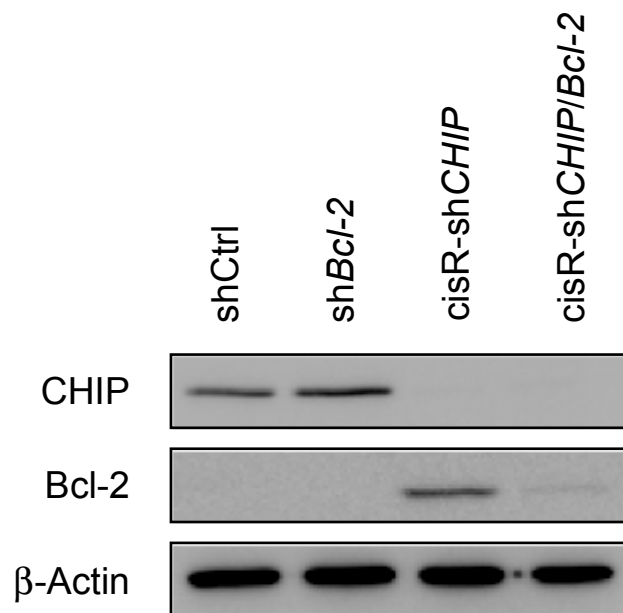


Figure 8. cisR-shCHIP/Bcl-2細胞におけるCHIP、Bcl-2の蛋白質量。shCtrl、shBcl-2、cisR-shCHIP、cisR-shCHIP/Bcl-2 MCF-7細胞から蛋白質を抽出し、CHIPとBcl-2の蛋白質量を調べた。

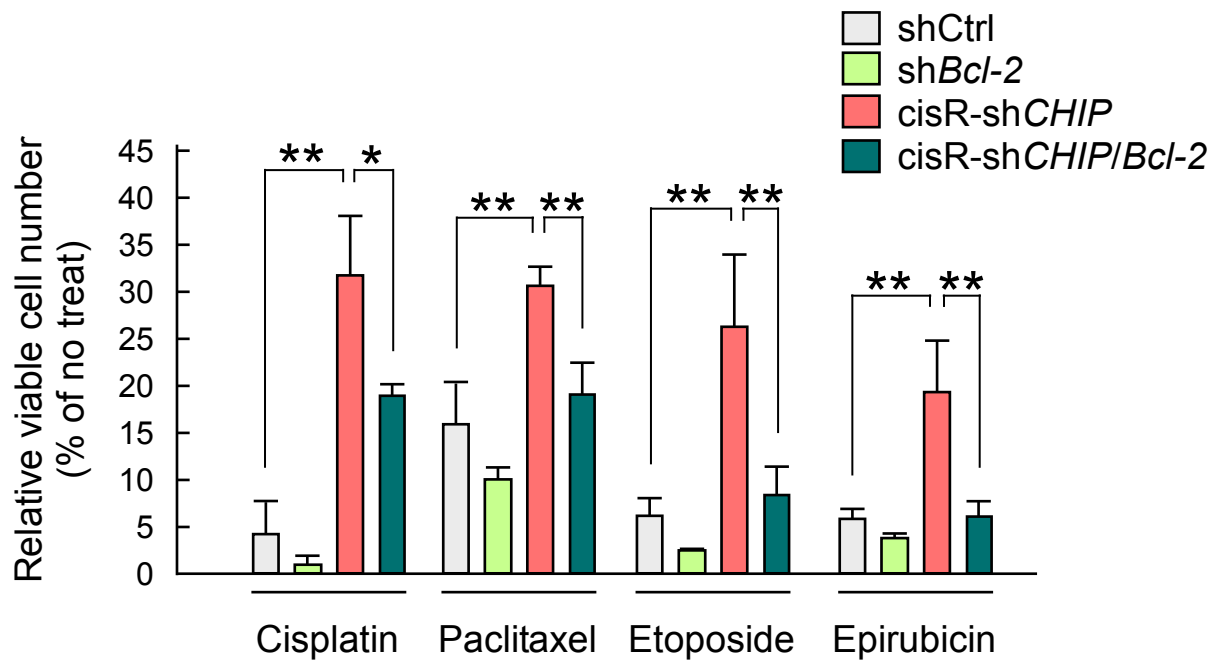


Figure 9. cisR-shCHIP/Bcl-2細胞の抗がん剤に対する感受性。shCtrl、shBcl-2、cisR-shCHIP、cisR-shCHIP/Bcl-2 MCF-7細胞に各抗がん剤を処理し、トリパンブルー染色を用いて48時間後の生細胞数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、 $n \geq 3$ 。

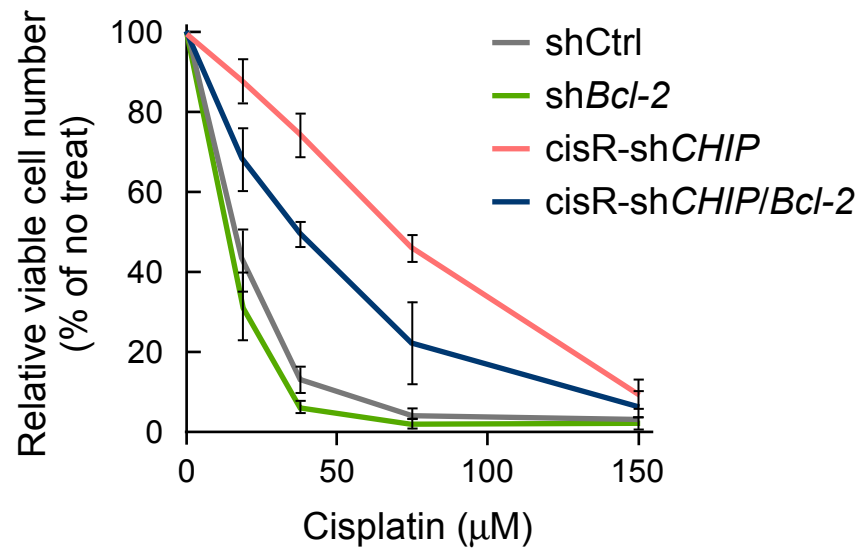
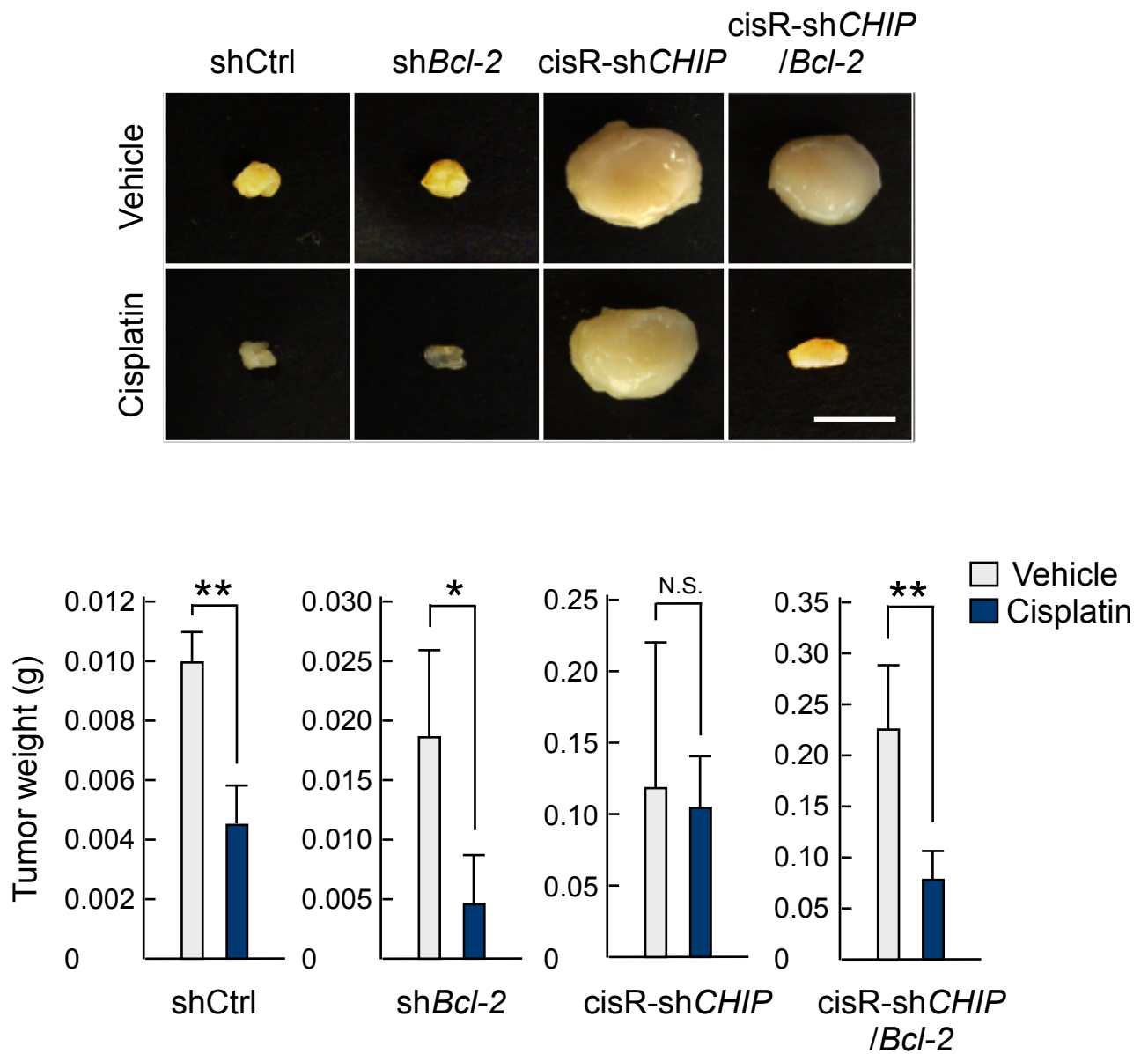


Figure 10. cisR-shCHIP/Bcl-2 細胞のシスプラチンに対する用量反応曲線。shCtrl、shBcl-2、cisR-shCHIP、cisR-shCHIP/Bcl-2 MCF-7細胞に19、38、75、150 μMのシスプラチンを処理し、トリパングルー染色を用いて48時間後の生細胞数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。n = 4。



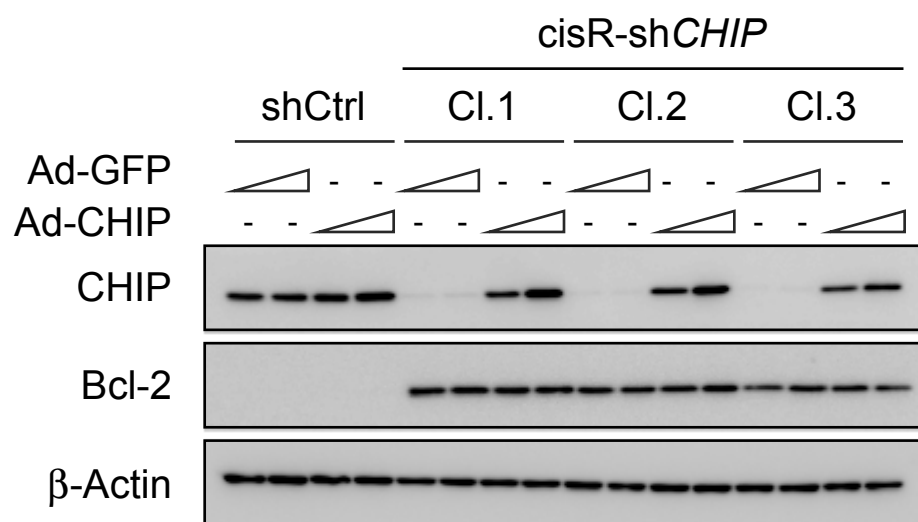


Figure 12. CHIPを再発現したcisR-shCHIP細胞におけるBcl-2蛋白質量。アデノウイルス (Ad) を用いてshCtrl、cisR-shCHIP MCF-7細胞にCHIPを発現させ、48時間後のBcl-2の発現量を調べた。GFPを発現するアデノウイルスをコントロールとして使用した。

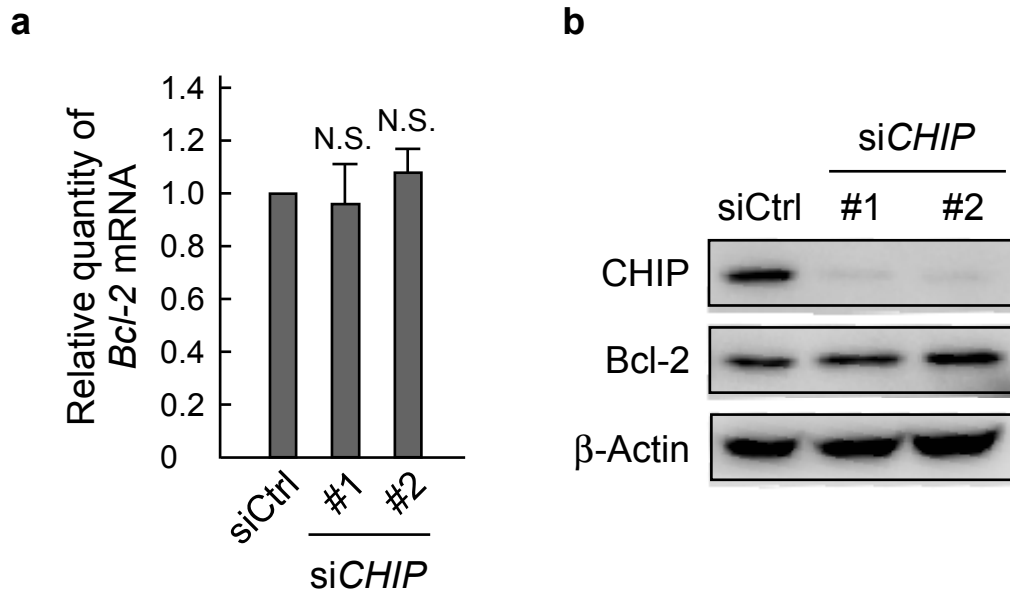


Figure 13. CHIPに対するsiRNA処理後のBcl-2の発現量。MCF-7細胞に対して、CHIPとluciferase (siCtrl) を標的としたsiRNAを導入し、48時間後の細胞を回収、Bcl-2発現量を調べた。(a) Bcl-2 mRNA量。(b) Bcl-2蛋白質量。エラーバーはS.D.を表している。n = 3 (a)、N.S.: not significant。

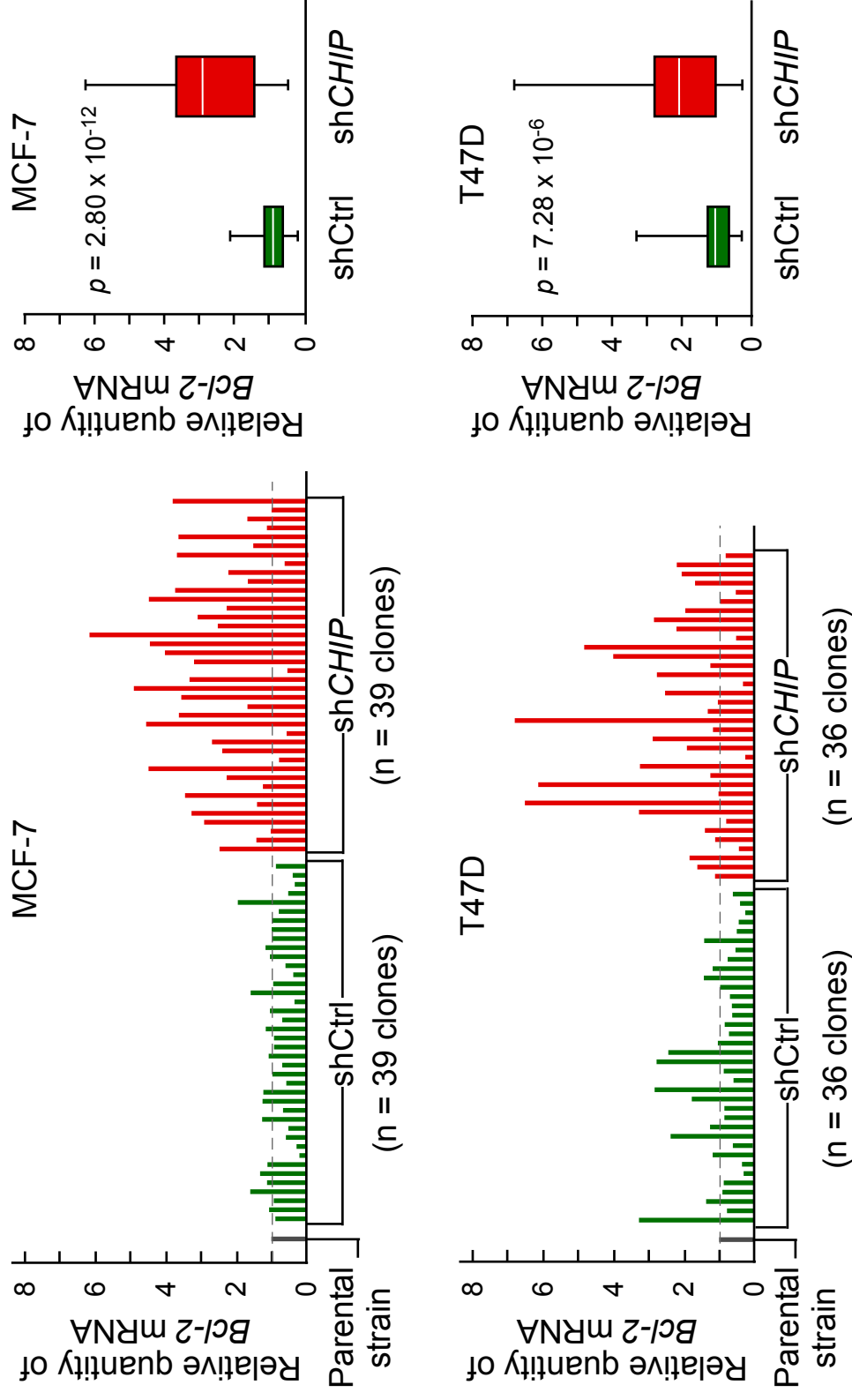


Figure 14. shCHIPクローンのBcl-2 mRNA発現量。shCtrl、shCHIP MCF-7およびT47D細胞から複数のクローンを単離し、それぞれのBcl-2 mRNA量を調べた（左図）。左図のデータをボックスプロットで示した（右図）。

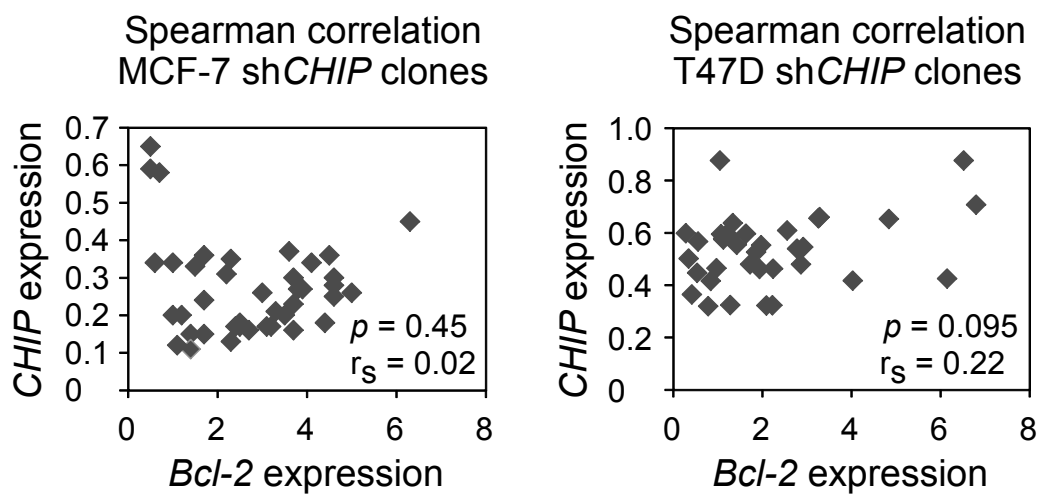


Figure 15. CHIPとBcl-2発現量の相関分析。shCHIP MCF-7 もしくはT47DクローンのCHIPと Bcl-2 mRNA量 (Figure 14) をSpearman相関分析によって解析した。

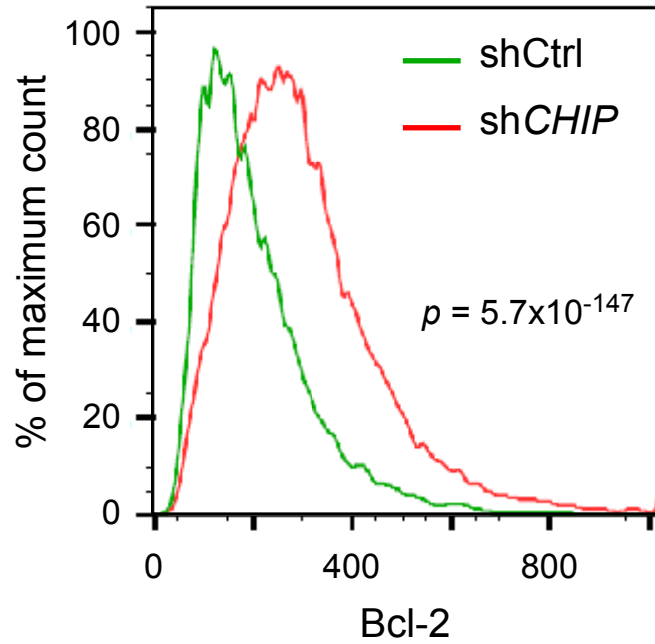


Figure 16. shCHIP細胞におけるBcl-2蛋白質発現パターン。shCtrl、shCHIP MCF-7細胞の1細胞ごとのBcl-2発現量をフローサイトメーターを用いて解析し、ヒストグラムで表した。

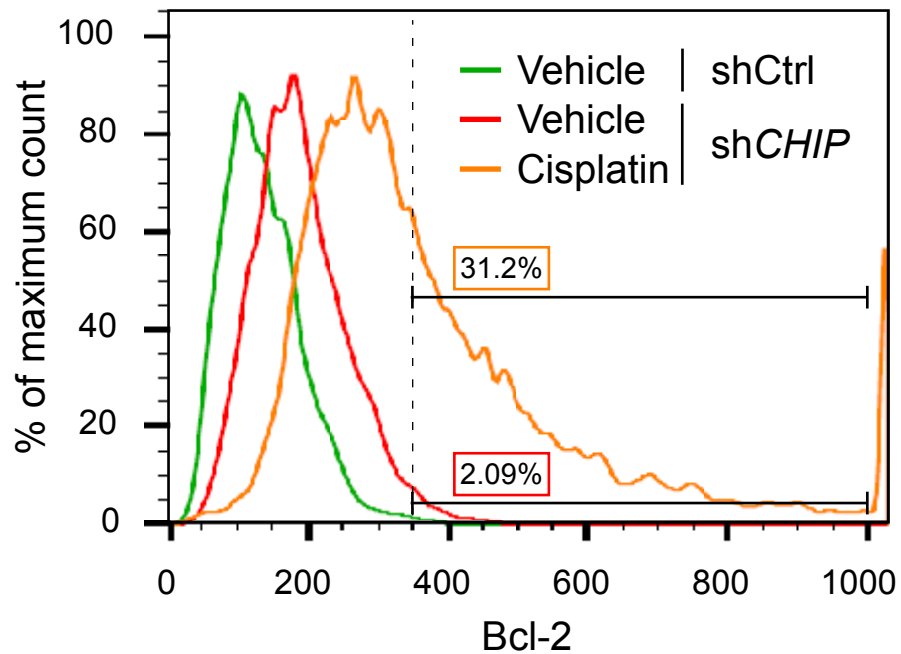


Figure 17. シスプラチン処理後のshCHIP細胞におけるBcl-2発現量。Figure 2と同様にshCHIP MCF-7細胞を5 μ Mシスプラチン含有培地で9日間培養後、生存した細胞のBcl-2の発現量をフローサイトメーターを用いて解析した。

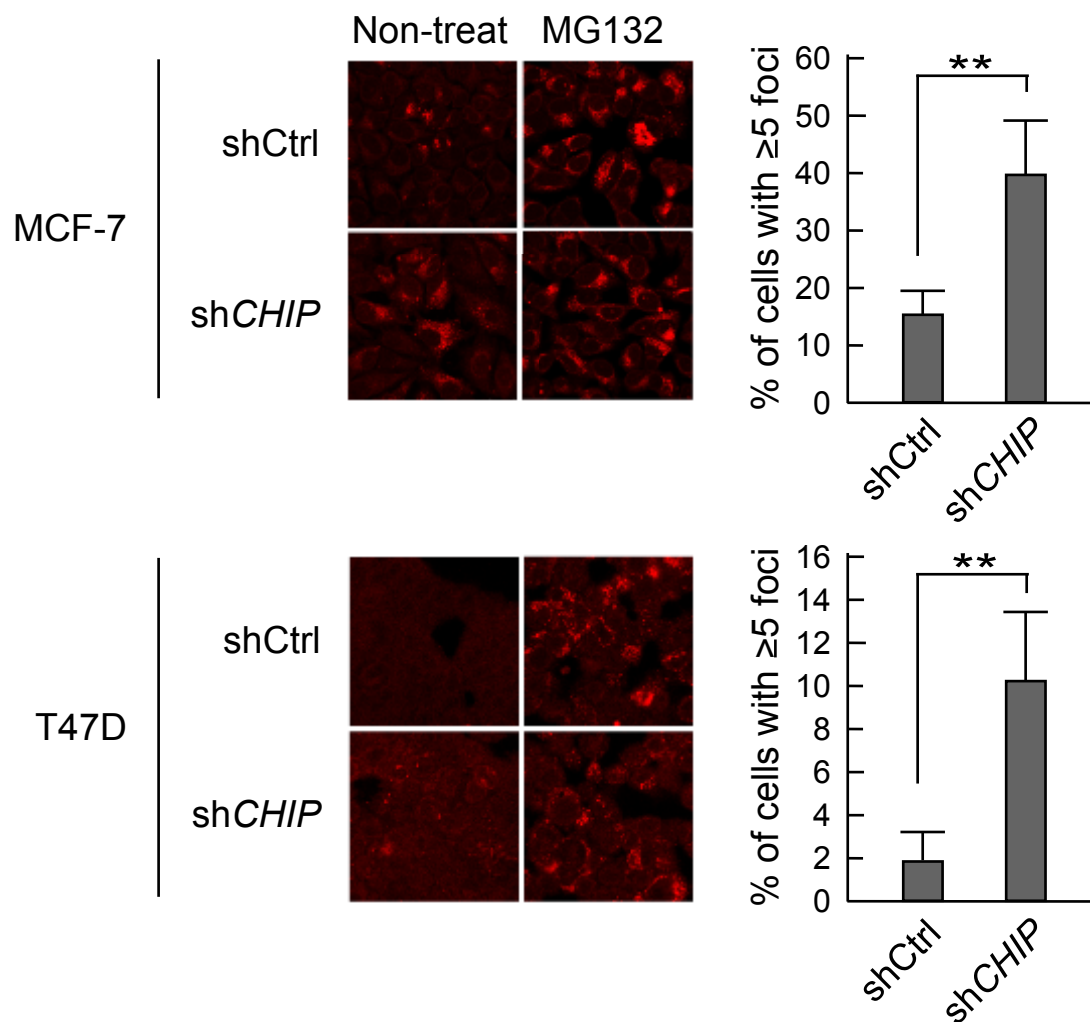


Figure 18. shCHIP細胞におけるアグリソーム形成。shCtrl、shCHIP MCF-7およびT47D細胞を、ProteoStat® Aggresome dyeを用いて染色し（左図）、1細胞内に5つ以上のfociを含む細胞数を計測した（右図）。アグリソーム染色の確認として、プロテアソーム阻害剤であるMG132を使用した。エラーバーはS.D.を表している。
 **p < 0.01、n = 4。

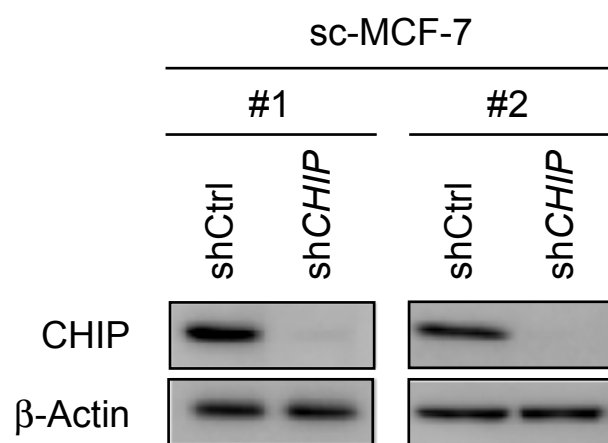


Figure 19. shCHIP sc-MCF-7細胞のCHIP発現量。MCF-7細胞から作成したクローン (sc-MCF-7 #1、#2) にLacZ (shCtrl) もしくはCHIP (shCHIP) に対するshRNAを導入した後、CHIPの蛋白質量を調べた。

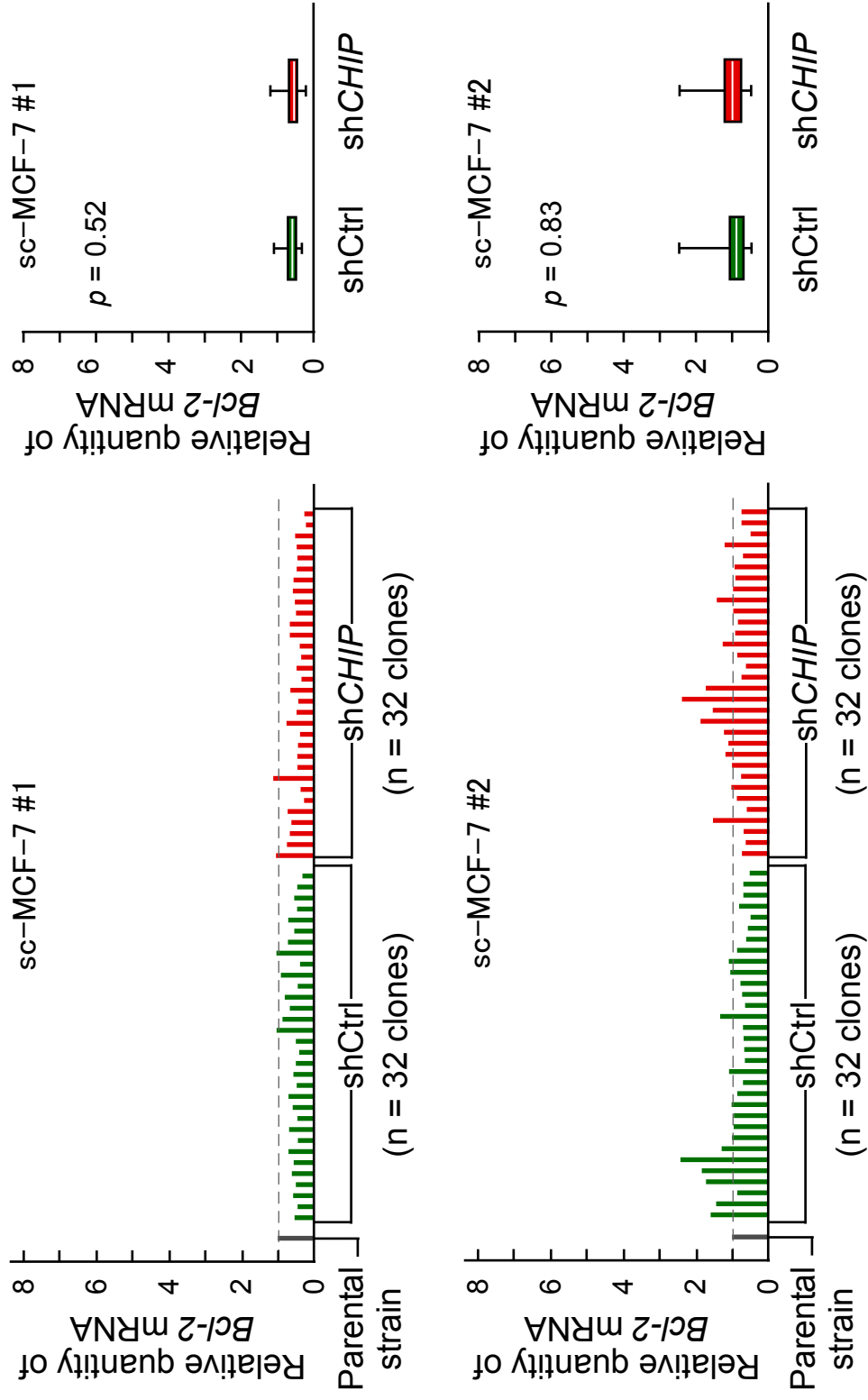


Figure 20. sc-MCF-7細胞由来shCHIPクローンにおけるBcl-2mRNA量。shCtrl、shCHIP sc-MCF-7 #1および#2細胞から複数のクローンを単離し、それぞれのBcl-2 mRNA量を調べた (左図)。左図のデータをボックスプロットで表した (右図)。

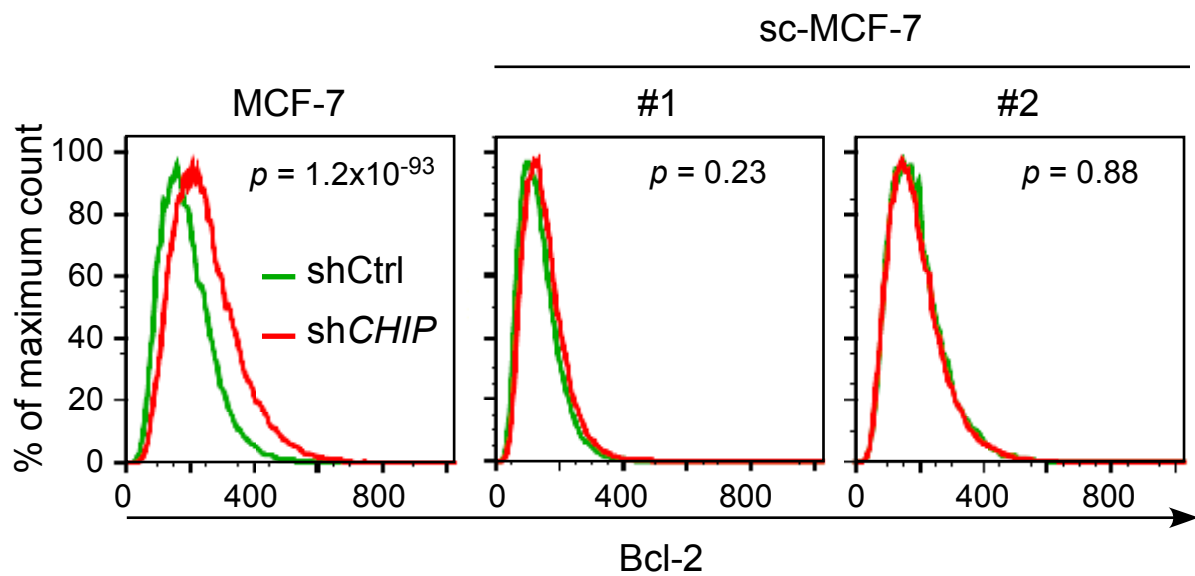


Figure 21. shCHIP sc-MCF-7細胞におけるBcl-2発現パターン。shCtrl、shCHIP sc-MCF-7#1および#2細胞のBcl-2発現パターンを、フローサイトメーターを用いて解析した。

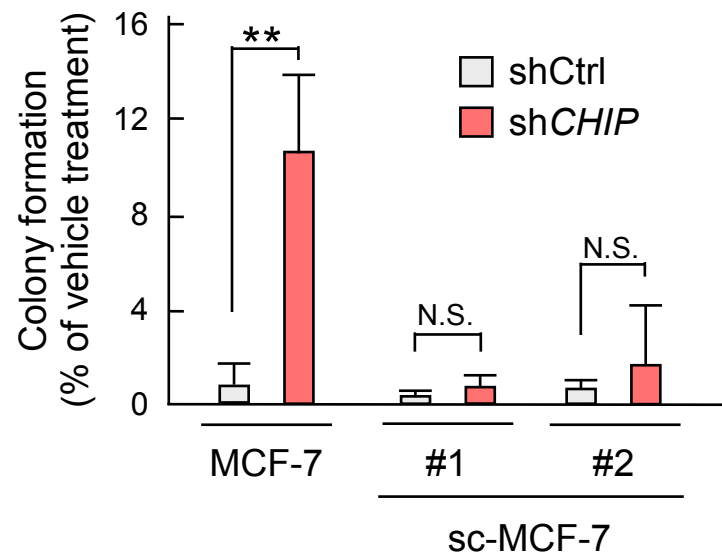


Figure 22. シスプラチン処理後のshCHIP sc-MCF-7細胞のコロニー形成。5 μ M シスプラチン含有培地でshCtrl、shCHIP MCF-7およびsc-MCF-7細胞を培養10日後、形成されたコロニーをクリスタルバイオレットを用いて染色し、その数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。** $p < 0.01$ 、N.S.:not significant、 $n = 3$ 。

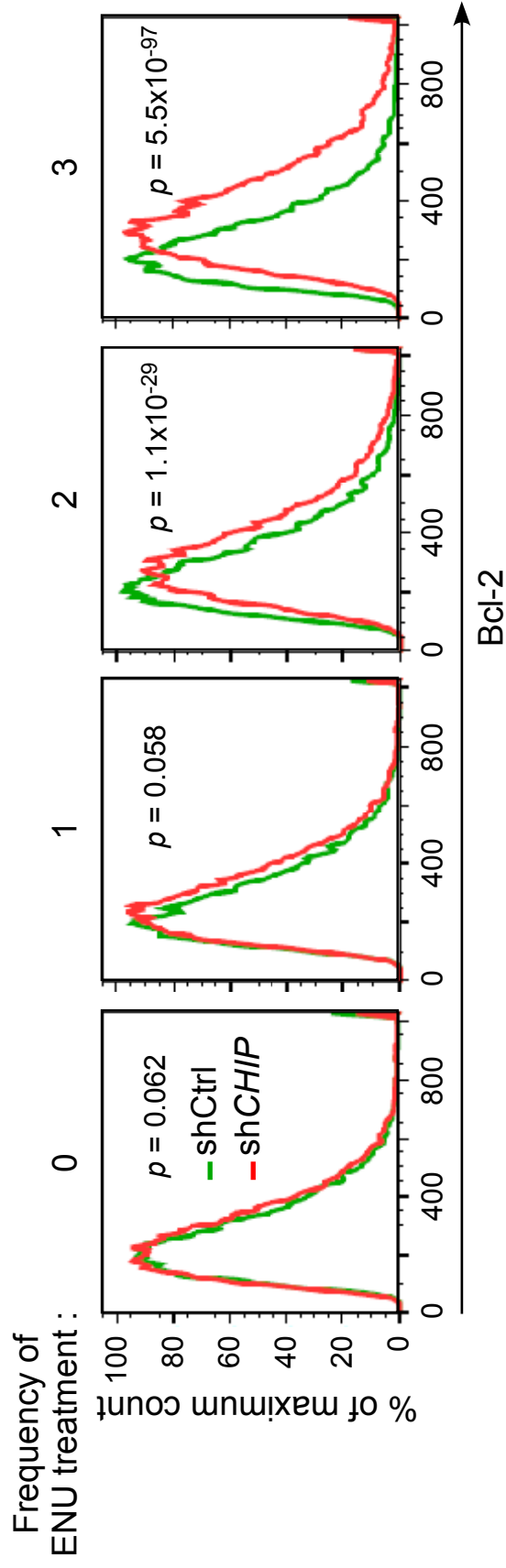


Figure 23. ENU処理shCHIP sc-MCF-7細胞におけるBcl-2発現パターン。shCtrl、shCHIP sc-MCF-7 #1細胞に週1回、3回に渡って1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ENUを処理し、処理回数ごとのBcl-2 発現パターンをフローサイトメーターを用いて解析した。

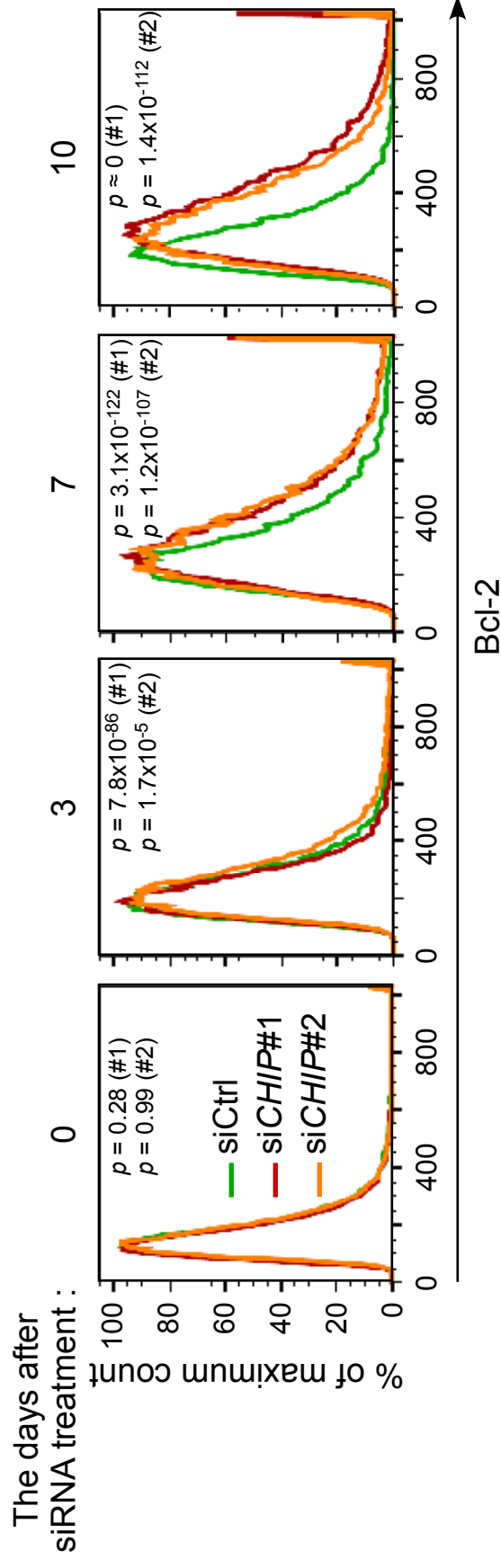


Figure 24. ENUおよびsiCHIP処理_{sc-MCF-7}細胞におけるBcl-2発現パターン。sc-MCF-7#1細胞に1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ENUを3回処理した後、CHIPを標的としたsiRNAをトランスフェクションした。siRNA処理後、フローサイトメーターを用いて継続的にBcl-2の発現パターンを解析した。最初のsiRNA処理から5日後に再度siRNAを処理した。

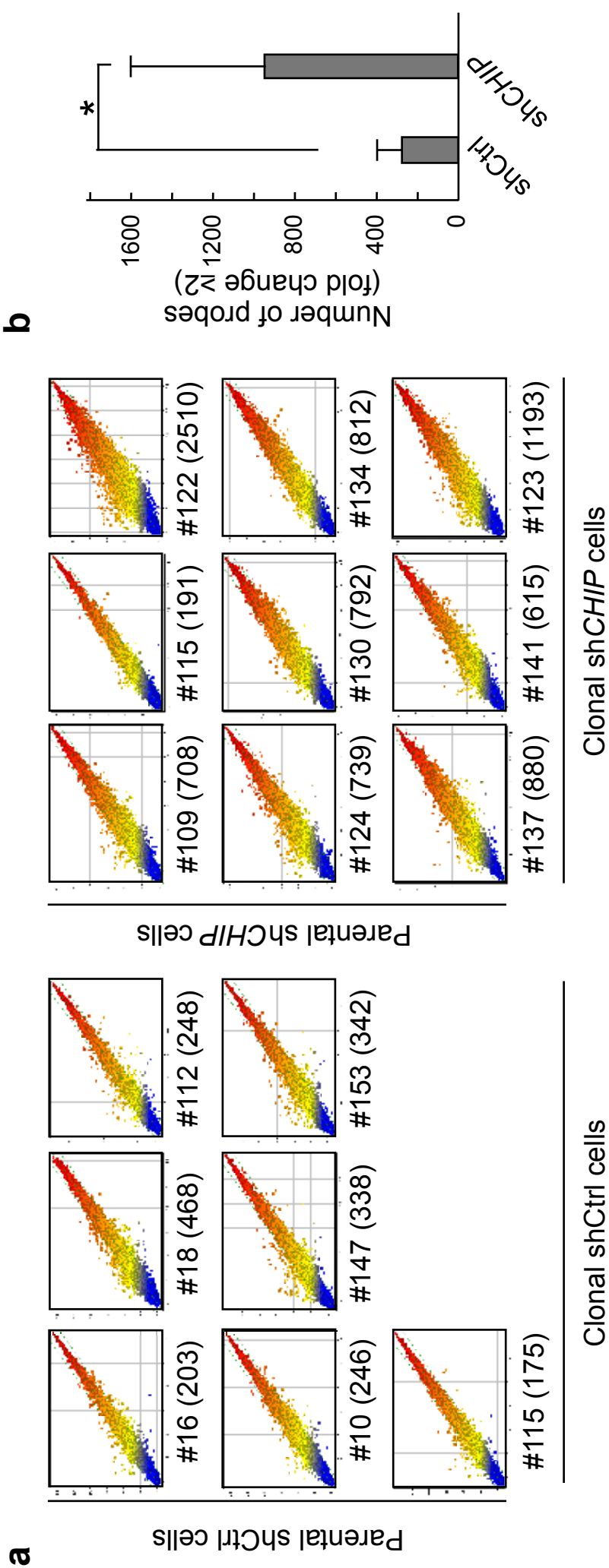


Figure 25. CHIPの減少が遺伝子発現全体に与える影響。(a) MCF-7細胞から作成したshCtrl、shCHIP親細胞と、それに由来するクローニングshCtrl、shCHIP細胞を用いてDNAマイクロアレイを行い、親細胞対クローニング細胞の遺伝子発現パターンの比較結果をスクヤッタープロットによって示した。(b) (a)で用いたDNAマイクロアレイデータの比較において、shCtrl、shCHIP親細胞と、クローニングshCtrl、shCHIP細胞間で発現量に2倍以上差があったプローブの数を検討した。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$, $n \geq 7$ 。

Gene symbol	Variance		F value	<i>p</i> value (two-tail)
	shCtrl	sh <i>CHIP</i>		
NANOG	0.00477	1.17614	246.72129	1.10587E-06
KLF4	0.01780	1.67868	94.30184	1.93033E-05
SOX2	0.00052	1.18805	2271.87546	1.43661E-09
CD44	2.33640	8.33219	3.56626	0.138664778

Table 1. shCHIPクローン間におけるCSC関連因子発現量の多様性。Figure 25のマイクロアレイデータを用いて、MCF-7由来のshCtrl、shCHIPクローン間におけるがん幹細胞関連因子発現量の分散を解析した。

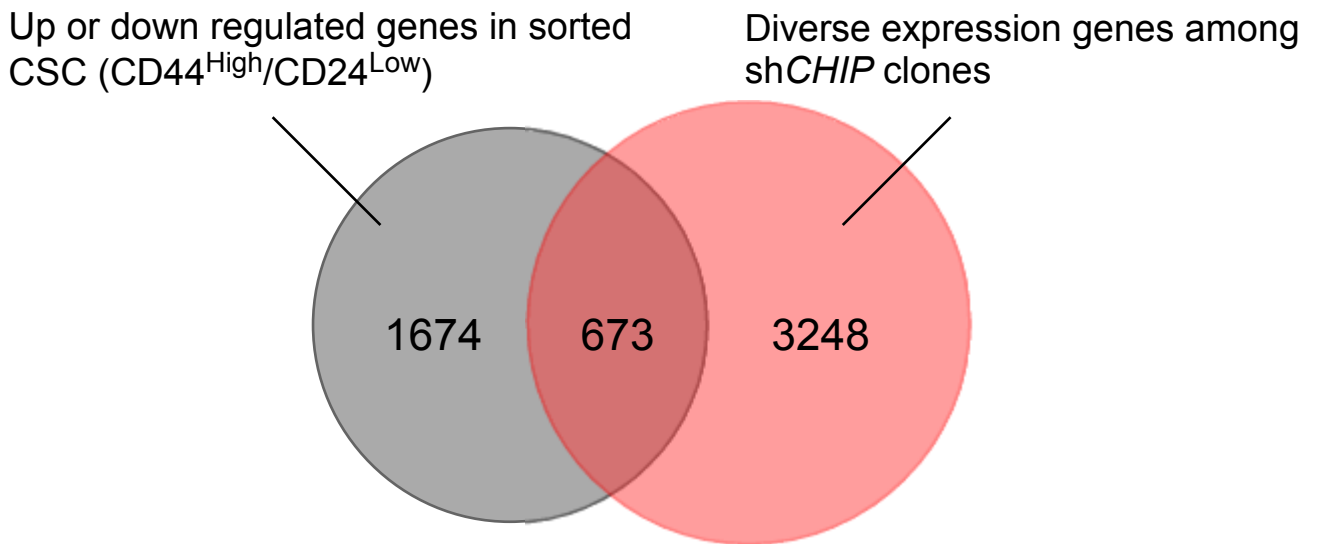


Figure 26. CHIPの減少によって多様性が現れる遺伝子群と、CSCにおいて発現が変化する遺伝子群の比較。Figure 25のアレイデータにおいてshCtrlクローンと比べ、shCHIPクローンで発現量の多様性が増した遺伝子 (F-test、 $p \leq 0.1$) と、CSC (CD44^{High}/CD24^{Low}) とnon-CSCにおいて発現が1.5倍以上異なる遺伝子群(GSE36643) の間で共通した遺伝子。

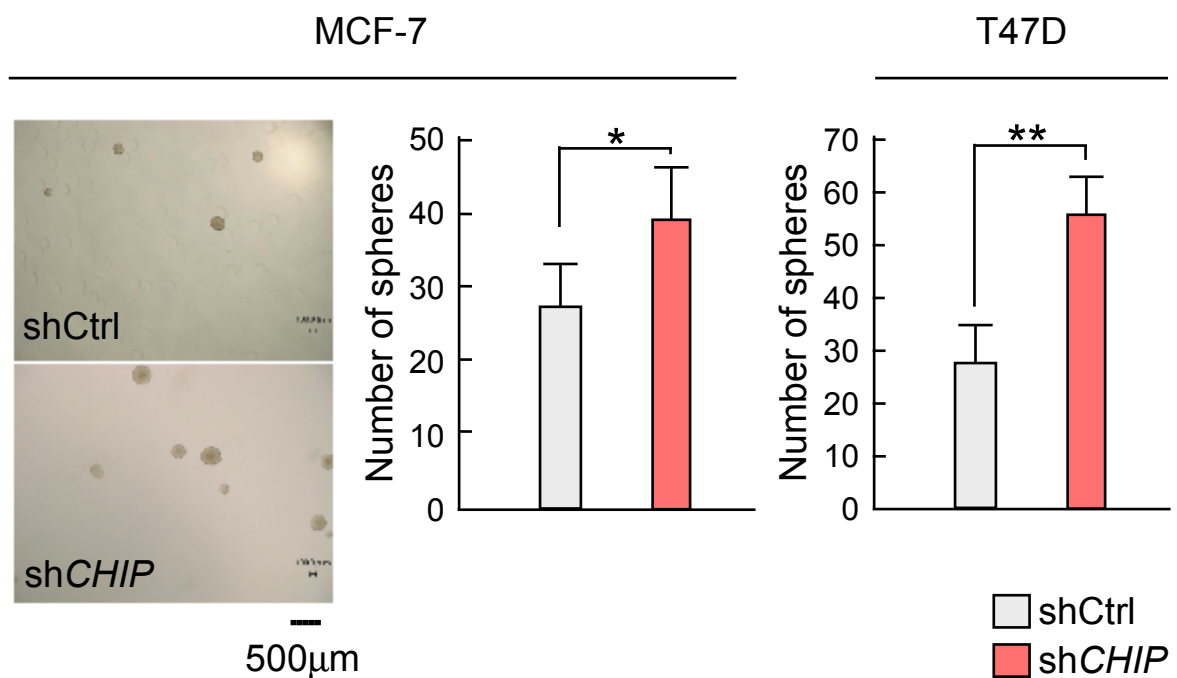


Figure 27. shCHIP細胞のスフィア形成能。shCtrl、shCHIP MCF-7およびT47D細胞で形成された100 µm以上のスフィア数を計測した。MCF-7細胞のスフィアの写真を左図に、スフィア数を右図に示した。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、 $n = 3$ 。

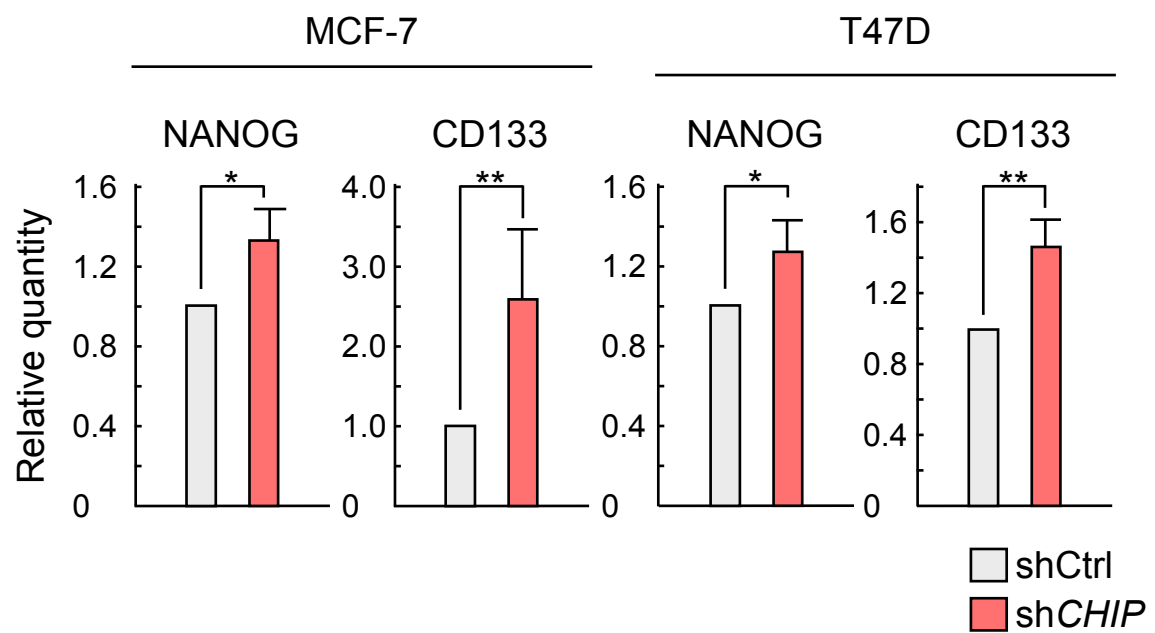


Figure 28. shCHIPスフィアにおけるCSC関連因子のmRNA量。shCtrl、shCHIP MCF-7およびT47D細胞由来のスフィアからRNAを抽出し、CSC関連因子のmRNA量を調べた。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、 $n \geq 3$ 。

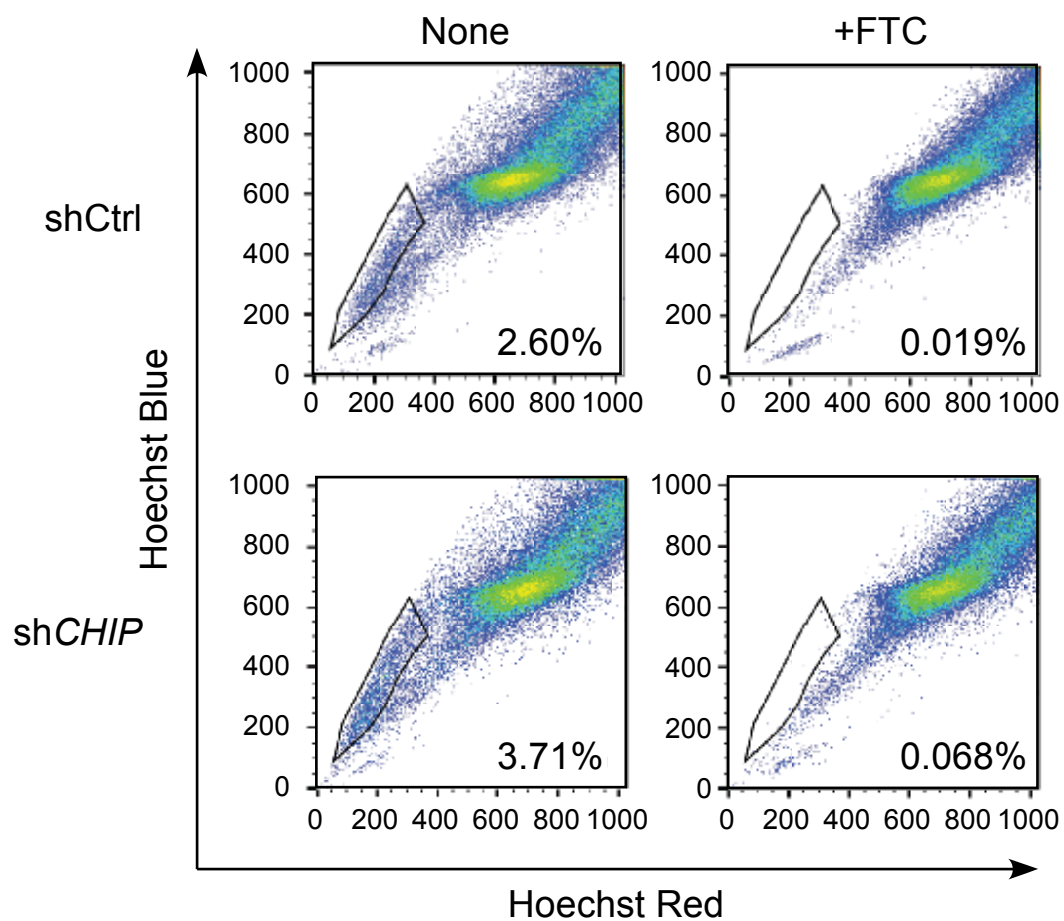


Figure 29. shCHIP細胞におけるSP細胞の割合。shCtrl、shCHIP MCF-7細胞を用いてSide population (SP) 細胞の割合を検討した。SPの領域の確認として、Fumitremorgin C (FTC) を用いた。(この結果は、Figure31でも使用している。)

Name of cell line	Number of cells injected				
	10^5	10^4	10^3	10^2	50
shCtrl	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4
shCHIP	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4

Table 2. shCHIP細胞の腫瘍イニシエーション能。shCtrl、shCHIP MCF-7細胞を 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、50 cells/tumorの各濃度で免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍形成率を検討した。

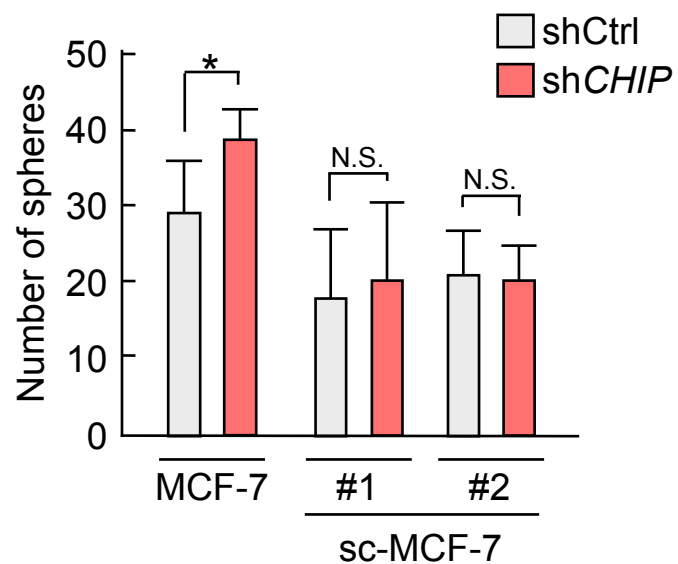


Figure 30. shCHIP sc-MCF-7細胞のスフィア形成能。shCtrl、shCHIP MCF-7およびsc-MCF-7#1、#2細胞を用いてスフィア形成実験を行った。エラーバーはS.D.を表している。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、N.S.:not significant、 $n = 3$ 。

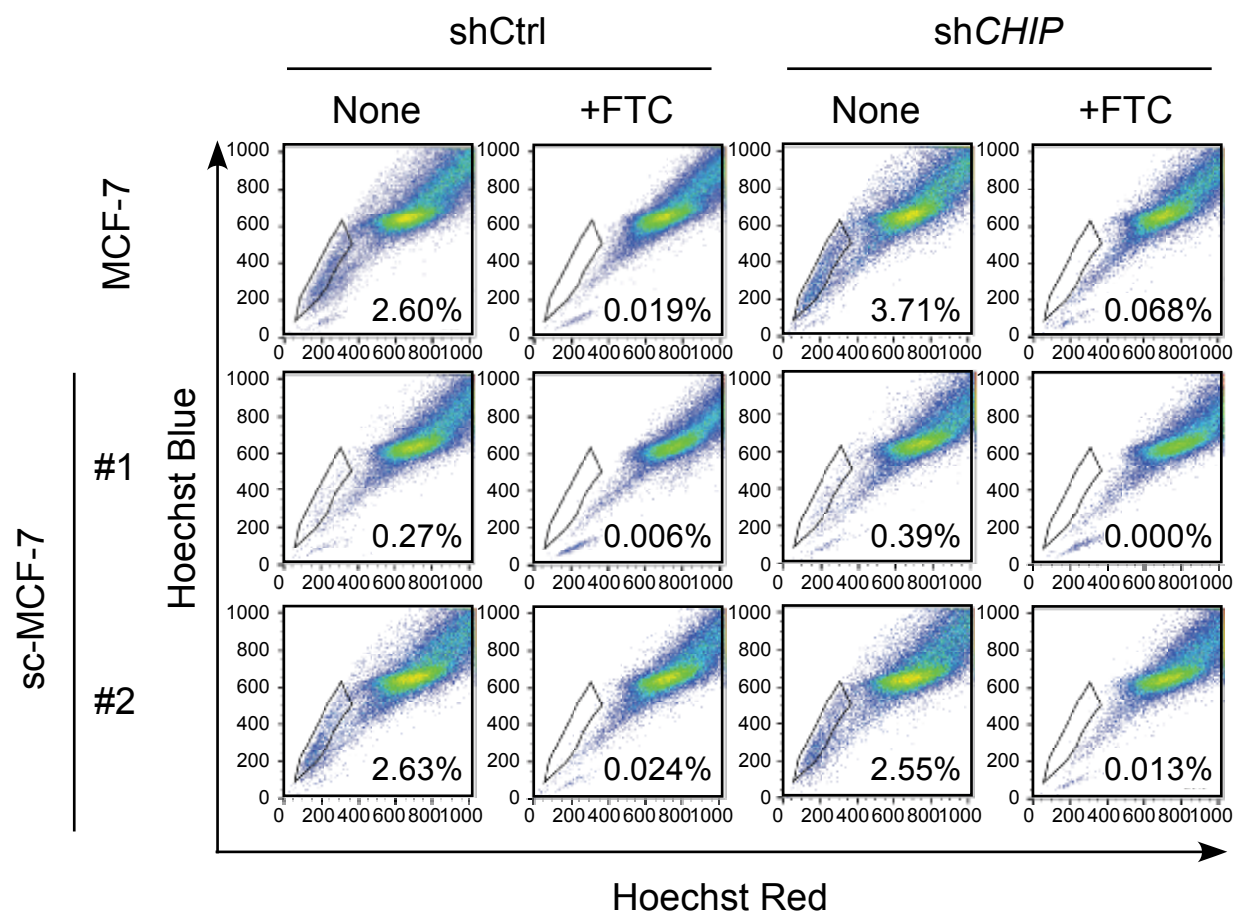


Figure 31. shCHIP sc-MCF-7細胞におけるSP細胞の割合。shCtrl、shCHIP MCF-7およびsc-MCF-7#1、#2細胞におけるSP細胞の割合を検討した。SP領域の確認として、FTCを用いた。(shCtrl、shCHIP MCF-7細胞の結果は、Figure29でも使用している。)

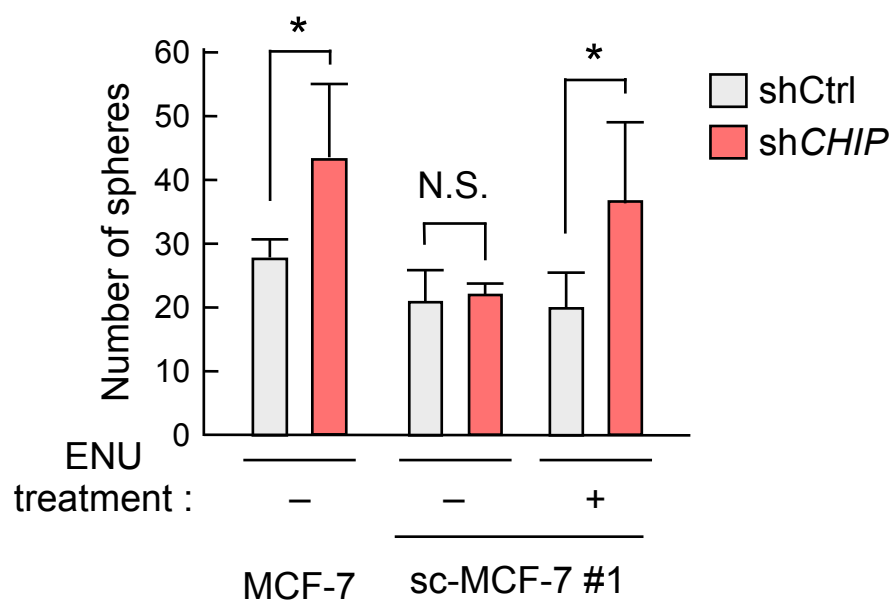


Figure 32. ENU処理shCHIP sc-MCF-7細胞のスフィア形成能。ENUを週1回、計3回処理したshCtrl、shCHIP sc-MCF-7#1細胞のスフィア形成数を計測した。エラーバーはS.D.を表している。* $p < 0.05$ 、N.S.: not significant、 $n = 3$ 。

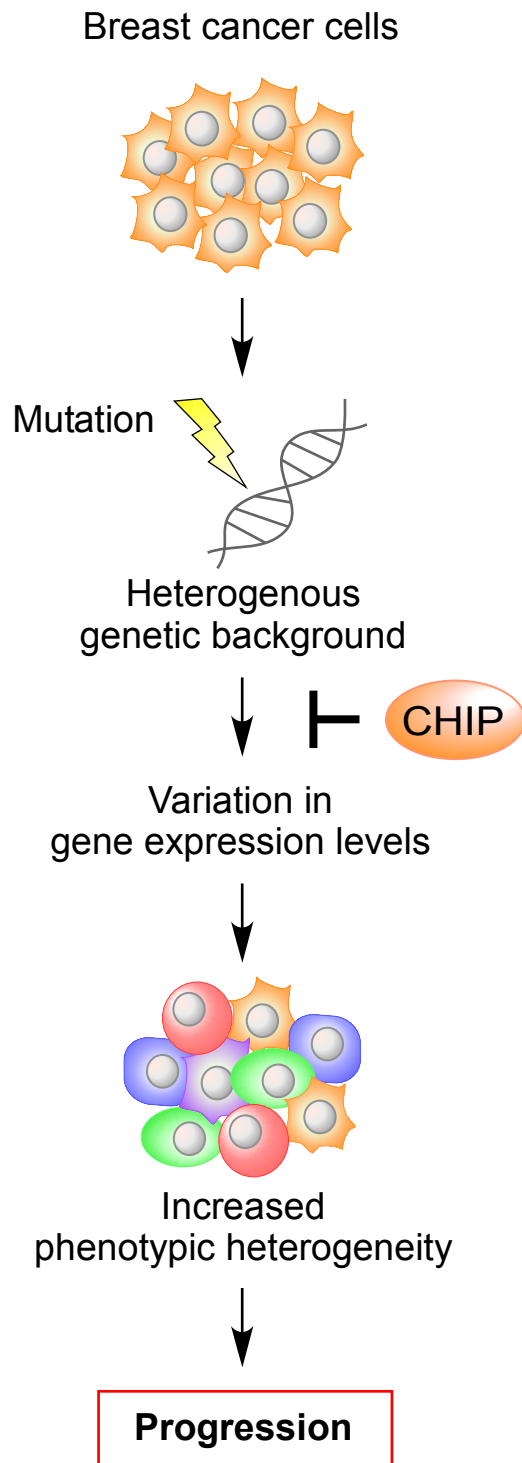


Figure 33. モデル図。CHIPは細胞間のジェネティックな背景の違いを隠し、遺伝子発現量の多様性を緩衝することによって、乳がん細胞の不均一性を抑え、がんの悪性化・進行を妨げる。